

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-518614

(P2001-518614A)

(43) 公表日 平成13年10月16日 (2001.10.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 1/10		G 0 1 N 1/10	N 2 G 0 4 2
1/00	1 0 1	1/00	1 0 1 F
31/20		31/20	
37/00	1 0 1	37/00	1 0 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁)

(21) 出願番号 特願2000-514114(P2000-514114)
 (86) (22) 出願日 平成10年9月25日 (1998.9.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年3月27日 (2000.3.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US98/19960
 (87) 国際公開番号 WO99/17093
 (87) 国際公開日 平成11年4月8日 (1999.4.8)
 (31) 優先権主張番号 08/938, 689
 (32) 優先日 平成9年9月26日 (1997.9.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ザ、リージェンツ、オブ、ザ、ユニバーシ
 ティ、オブ、ミシガン
 THE REGENTS OF THE
 UNIVERSITY OF MICHIGAN
 アメリカ合衆国ミシガン州、アン、アーバ
 ー、サウス、ステイト、ストリート、3003
 ウォルバリン、タワー、ルーム、2071
 (72) 発明者 ハンディク、カルヤン
 アメリカ合州国 48105 ミシガン州、ア
 ン、アーバー、プリマウス、ロード
 1929、アパートメント ナンバー5012
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移動マイクロ弁

(57) 【要約】

マイクロチャンネルを通してのマイクロ液滴の移動及び混合がマイクロ規模装置を用いて記述される。サンプル及び試薬を流入口 (A) を通して装置に注入し、それらを別々の液滴としてチャンネル (B) を通して反応チャンバ、例えば、混合及び反応 (例えば、制限酵素消化又は核酸増幅) が行われる熱的に制御された反応器 (C) に輸送する。次に、それらの生化学的生成物を同じ方法によって電気泳動モジュール (D) に移動させ、そこで移動データを検出器 (E) によって集めて記録器機に送信する。重要なことには、これらの流体及び電気構成成分は機能及び構成が生物学的反応及び試薬に完全に適合するように設計されている。

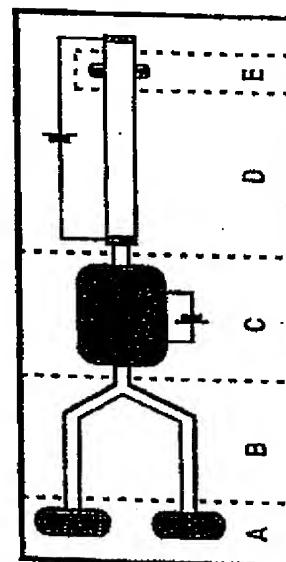


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板にエッチングされたマイクロ液滴輸送チャンネルを含む装置であつて、該基板がシリコン、石英及びガラスからなる群より選択され、該チャンネルが1つ以上の疎水性領域を含む装置。

【請求項2】 前記装置が前記マイクロ液滴チャンネルと流動連絡している気体取り込み通路をさらに含む、請求項1の装置。

【請求項3】 前記装置が前記マイクロ液滴チャンネルと流動連絡している通気孔をさらに含む、請求項2の装置。

【請求項4】 前記疎水性領域の1つが前記チャンネル内の前記気体取り込み通路と前記通気孔との間に位置する請求項3の装置。

【請求項5】 前記気体取り込み通路と連絡している空気チャンバをさらに含む、請求項2の装置。

【請求項6】 ミクロ液滴輸送チャンネルを含む装置であつて、該チャンネルがi) 第1及び第2端部、及びii) 該チャンネル内の該第1及び第2端部の間に配置される疎水性領域を含む装置。

【請求項7】 i) 前記チャンネルの前記第1端部内に位置し、かつii) 前記マイクロ液滴チャンネルと流動連絡している気体取り込み通路をさらに含む、請求項6の装置。

【請求項8】 i) 前記チャンネルの前記第2端部内に位置し、かつii) 前記マイクロ液滴チャンネルと流動連絡する通気孔をさらに含む、請求項7の装置。

【請求項9】 前記疎水性領域が前記チャンネル内の前記気体取り込み通路と前記通気孔との間に位置する請求項8の装置。

【請求項10】 前記チャンネルの前記第1端部が液体を導入するための導入口を含む請求項6の装置。

【請求項11】 前記気体取り込み通路と連絡する空気チャンバをさらに含む請求項7の装置。

【請求項12】 ガラス、石英又はシリコン基板から製造される、請求項6の装置。

【請求項13】 前記チャンネルの深さが5ないし20 μ mであり、かつ幅が20ないし

100 μ mである、請求項12の装置。

【請求項14】マイクロ液滴を移動させるための方法であって、

(a) マイクロ液滴輸送チャンネルを含む装置を提供し、ここで該チャンネルは
i) 1つ以上の疎水性領域を有し、かつii) 気体源と連絡し；

(b) 液体を、該液体が該疎水性領域の1つで停止するような条件下で該チャンネル内に導入してi) 該チャンネル内に配置された液滴の源及びii) 液体が接する疎水性領域を規定し；及び

(c) 別々の量の液体を、該マイクロ液滴の源から、該気体源からの気体を用いて、規定されたサイズのマイクロ液滴が該液体が接する疎水性領域とi) 接触し、かつii) それを越えて移動するような条件下で分離する、
ことを含む方法。

【請求項15】前記気体源が気体取り込み通路を介して前記チャンネルと連絡する、請求項14の方法。

【請求項16】前記マイクロ液滴チャンネルと流動連絡する通気孔をさらに含み、かつ工程(c)の前記マイクロ液滴が該通気孔を通過して移動する、請求項15の方法。

【請求項17】前記疎水性領域の1つが前記チャンネル内の前記気体取り込み通路と前記通気孔との間に位置する、請求項16の方法。

【請求項18】前記チャンネルの深さが5ないし20 μ mであり、かつ幅が20ないし100 μ mである請求項14の方法。

【請求項19】工程(c)において分離される別々の量の液体が約0.01ないし100ナノリットルの容積を有する、請求項14の方法。

【請求項20】容積が10ないし15ナノリットルである請求項19の方法。

【発明の詳細な説明】

本出願は、1995年9月15日出願の、係属中の米国特許出願第08/529,293号の一部継続出願であるところの、1997年7月3日出願の、係属中の米国特許出願第08/88,309号の一部継続出願である。

【0001】

本発明は、ナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルスによって与えられた政府支援によってなされた（許可番号NIH-R01-HG01044及びNIH-R01-HG01406）。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】**【発明の属する分野】**

本発明は、マイクロチャンネルによってマイクロ液滴を移動することに関し、特にマイクロ液滴のサイズ及び移動を制御するための組成物、装置及び方法に関する。

【0003】**【背景】**

生物学的反応の複雑性とパワーは、最近30年間に劇的に増加した。「ハイブリダイゼーション」プロセスの最初の観察、すなわち、Marmur及びLane, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 46, 453 (1960)及びDotyら, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 46, 461 (1960)による、相補的配列を含む核酸の2つのポリマーが互いを見つけ出し、塩基対相互作用によってアニーリングする能力が、このプロセスをさらに現代生物学の必須のツールへと改良した。

【0004】

Hayashiら、Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 50, 664 (1963)によって行われたような、最初のハイブリダイゼーション研究は、溶液中で形成された。さらなる発展は、固体支持体上の標的DNA又は標的RNAの固定化へ導いた。Smith及びWilcox, J. Mol. Biol. 51, 379 (1970)による特異的制限エンドヌクレアーゼの発見により、DNAの不連続断片の単離が可能になった。Southern, J. Mol. Biol. 98, 503 (1975)によって記載されたような、固定化技術の利用は、制限酵素との組み合わせで、分画されたゲノムDNAの集合体の中で個々にコピーされた遺伝子のハイブリダイゼーションによる同定を可能にした。

【0005】

1997年に、2つのDNA配列決定方法が報告された。これらは、Maxam及びGilbert (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:560 (1997))の化学的減成法及びSangerら (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:5463 (1997))の酵素的な方法であった。両方法は、固定された点で始まり、固定された残基又は残基タイプで無作為に終わる放射標識されたオリゴヌクレオチドの集団を生産する。これらの集団は、ヌクレオチド1個ほどのわずかな長さで相違するオリゴヌクレオチドの間での識別を可能にするポリアクリルアミドゲル上で決定される。

【0006】

Maxam及びGilbertの方法は、5つの独立した化学反応で部分的に開裂され、そしてそのそれぞれが、特定の塩基又は塩基タイプに特異的である、一方の末端で放射標識されたDNAの断片を利用する。これらの化学反応の生成物は、標識末端から化学開裂部位へ伸長する標識分子の5つの集団である。この方法は、その初期の発展故に比較的变化せずに残されている。この方法は、標識末端からヌクレオチド250個未満のDNA配列に最良に働く。

【0007】

対照的に、Sangerの方法は、反応の単一セットでヌクレオチド500個を超える配列が可能である。Sangerの方法は、鎖-停止 (chain-terminating) ジデオキシヌクレオチド (ddNTPs) を利用する酵素反応である。ddNTPsは、続くデオキシリボヌクレオチド (dNTP) とのホスホジエステル結合の形成を妨げる3'-ヒドロキシル残基を欠くので、鎖-停止する。1つのddNTPの少量が、重合反応中に4つの通常のdNTPsと共に含まれる。重合又はDNA合成は、DNAポリメラーゼによって触媒される。通常のdNTPsの結合による鎖伸長とddNTPの結合による鎖停止との間で競合がある。短いオリゴヌクレオチド又はプライマーは、配列されるべきDNAを含む鋳型にアニーリングされる。オリジナルプロトコールは、1本鎖DNA鋳型を必要とした。2本鎖鋳型の使用は、後に報告された。プライマーは、ポリメラーゼ酵素及びdNTPsが与えられたときに、DNA鎖を重合させる3'-ヒドロキシル基を提供する。

【0008】

Sangerの方法のオリジナル版は、大腸菌DNAポリメラーゼのKlenow断片を利用した。この酵素は、修飾されていないポリメラーゼの重合及び3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しているが、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。Klenow断片は、酵素的配列に用いる場合、幾つかの制限を有する。1つの制限は、酵素の低加工性(processivity)であり、そしてそれはddNTPの結合による所望の停止によってよりもむしろ、鋳型からの酵素の無作為の解離によって停止する、断片の高いバックグラウンドを生成する。低加工性はまた、酵素がプライマーの5'末端から~250個を超えるヌクレオチドが出現するヌクレオチドの配列に用いることができないことを意味する。第2の制限は、Klenowが、ホモポリマートラクト(tracts)又は高い二次構造の領域を有する鋳型を効率的に利用できないことである。鋳型中の二次構造によって引き起こされる問題は、重合反応を55℃で行うことによって最小化できる。

【0009】

オリジナルSanger法の改良は、Klenow断片以外のポリメラーゼの使用を含む。逆転写酵素は、ホモポリマー性(homopolymeric)トラクトを有する鋳型の配列に用いられてきた。逆転写酵素は、ホモポリマートラクトを含む鋳型を利用する場合のKlenow酵素よりもいくらか良好である。

【0010】

修飾されたT7 DNAポリメラーゼ(Sequenase(商標))の使用は、Sanger法に対する最も著しい改良であった。Sambrook, Jら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 13.7-13.9及びHunkapiller, M. W. (1991) Curr. Op. Gen. Devl. 1:88-92参照。Sequenase(商標)は、減少した3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する化学的に修飾されたT7 DNAポリメラーゼである。Taborら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4767 (1987)。Sequenase(商標)バージョン2.0は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を完全に欠いたT7ポリメラーゼの遺伝子的に設計された形態である。Sequenase(商標)は、非常に高い加工性及び高い重合速度を有する。それは、配列決定ゲル中の圧縮(compression)領域を決定するのに用いられるdITP及び7-deaza-dGTPなどのヌクレオチド相同体(analog)を効率的に結合することができる。高い

G + C 含量を含むDNA領域において、そのDNA中での圧縮を導くHoogsteen結合形成が起き得る。これらの圧縮は、配列決定ゲル上でオリゴヌクレオチド鎖の異常な移動パターンをもたらす。これらの塩基相同体は、通常のヌクレオチドと弱く対形成するので、鎖内 (intrastrand) 二次構造が緩められる。対照的に、Klenowは、同様に効率的にこれらの相同体と結合しない。Sequenase (商標) を用いる鎖-停止反応の単一セットから得られるDNA配列の量に対する主な制限は、ポリアクリルアミドゲルの決定力であり、酵素の特性ではない。

【0011】

Taq DNAポリメラーゼの使用は、Sanger法の改良へのより最近の付加である (Innisら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9436)。Taqポリメラーゼは、70-75°Cで効率的に働く熱安定性酵素である。高い温度でのDNA合成を触媒する能力は、Taqポリメラーゼを、37°C (Klenow及びSequenase (商標) 反応に用いられる標準温度) での広範囲の二次構造を有する配列決定鋳型として有用にする。Taqポリメラーゼは、Sequenase (商標) と同様の程度の高い加工性を有し、Sequenaseバージョン2.0と同様に、3' → 5' ヌクレアーゼ活性を欠いている。

【0012】

方法は、直接配列決定なしで単一塩基変化の試験のためにも発展した。これらの方法は、突然変異又は他の配列変化の存在のためのDNA断片の「スキャニング (scanning)」を念頭に入れている。例えば、興味ある突然変異が、制限認識配列中で起きた場合、消化パターンにおける変化は、診断ツールとして使用できる (例えば、制限断片長多形 (RFLP) 分析)。

【0013】

これらの複合体及び強力な生物学的技術の発展によって、大がかりなプロジェクトが着手された。このプロジェクトは、ヒトゲノムプロジェクト (HGP) と呼ばれ、 3×10^9 個のDNAヌクレオチド塩基対を含む原型的なヒトゲノム配列の完全な特徴付けを含む。プロジェクトの絶対的なゴールは、全てのヒトはDNA配列レベルでは99%を超えて同一であるという認識である。人間の間の差異は、しかしながら、疾病の危険率の潜在的な評価又は特定の医療処置に対する応答を含む、個体の健康ケアに最も関連ある情報を提供する。HGPの完了した際には、ヒト遺

伝学研究学会 (human genetics research community) の継続的な努力は、ヒトの中での差異及び定義された原型からの個体の変異の試験であろう。HGPの15年間の努力がDNAデータ獲得に代表される一方、DNA情報の将来の要求は、個体遺伝子的変異に結びつけられており、従って際限がない。

【0014】

最新のDNA遺伝子型決定 (genotyping) 技術は、年に数百から数千の数に及ぶサンプルの詳細な分析に適している。数百万オーダーのアッセイに関する遺伝子型決定プロジェクトは、しかしながら、(i) 試薬及びDNA鋳型溶液の液体取り扱い、(ii) 溶液容積測定、(iii) 試薬と鋳型の混合、(iv) 混合溶液の制御された熱的反応、(v) 電気泳動ゲル上のサンプルローディング、及び(vi) サイズ分離ゲル上のDNA産物検出における現在の非効率故に、今日の研究所の能力を超えている。必要なことは、これらの非効率の存在無く高容量の生物学的反応を考慮に入れる方法である。

【0015】

【発明の概要】

本発明は、マイクロチャンネルによってマイクロ液滴を移動することに関し、特にマイクロ液滴のサイズ及び移動を制御するための組成物、装置及び方法に関する。本発明は、ミクロスケール装置のマイクロ加工及びミクロスケール装置での反応、特に、例えば生物学的反応を開始させるための、マイクロチャンネルを通してのマイクロ液滴中の生物学的サンプルの移動を含む。

【0016】

本発明は、親水性領域及び疎水性領域を有するマイクロ液滴輸送チャンネル、反応容器、気体取り入れ経路及び通気孔、電気泳動モジュール、並びに限定されないが放射検出器を含む検出器を含むミクロスケール装置を意図している。ある実施態様では、装置はさらに、空気室を含み、内部的に空気圧を発生させてマイクロ液滴を分け、移動する (すなわち、「オンチップ (on-chip) 」圧力発生) 。

【0017】

好ましい実施態様においては、これらの構成要素はシリコン及びガラス基板からマイクロ加工されている。多様な構成成分が、これに限定されないが、不連続の

小滴が個別に加熱され、エッチングされたチャンネルを通して推進される、表面張力勾配機構 (surface-tension-gradient mechanism) を含む流れ方向付け手段 (flow directing means) を含む、流れを方向付ける手段を用いて結合されている (すなわち、液体連絡)。エレクトロニクス構成成分は、同じ基板素材上に加工され、センサー及び制御回路部品が同じ装置内に組み込まれるようにする。全ての構成成分が通常の写真平板技術を用いて作られているので、複合構成成分装置は、複雑に統合されたシステムに容易に組み立てることができる。

【0018】

本発明は、ミクروسケール装置中で行われる反応の性質によって制限されることを意図していない。反応は、これらに限定されないが、化学的反応及び生物学的反応を含む。生物学的反応は、これらに限定されないが、配列決定、制限酵素消化、RFLP、核酸増幅、及びゲル電気泳動を含む。本発明は、生物学的反応を行うための特定の目的によって制限されることも意図していない。1つの医療診断応用においては、ヘテロ接合及びホモ接合標的の間で識別することが望ましく、後者の場合には、ホモ接合の存在を特定することが望ましい。与えられた遺伝子位置 (locus) が対立遺伝子 A 又は対立遺伝子 a をコードする場合、アッセイは、対立遺伝子の aa 対及び Aa 対から AA を識別する。もう1つの医療診断応用においては、臨床サンプル中の病原体の特定の対立遺伝子変異の存在又は不存在を単に検出することが望ましい。例えば、細菌の異なる種又は亜種は、抗体に対する異なる感受性を有し；特定の種又は亜種の存在の迅速な同定は、診断を助け、適切な治療を開始させる。

【0019】

本発明は、(a) シリコン中にエッチングされたマイクロ液滴輸送チャンネル内に配置され、該輸送チャンネルによって反応領域と液体連絡しており、液体バリアーによってマイクロ液滴流方向付け手段から分離されている該チャンネルに、液体マイクロ液滴を提供すること、及び (b) 該輸送チャンネル中の該マイクロ液滴を該マイクロ液滴流方向付け手段によって該反応領域に運搬することを含む、マイクロ液滴を移動する方法を意図している。本発明は、マイクロ液滴流方向付け手段の特定の性質によって限定されることを意図していない。1つの実施態様においては、該

輸送チャンネルに沿って配置された一連のアルミニウム加熱素子を含み、マイクロ液滴は、加熱素子によってマイクロ液滴の個別的な加熱によって運搬される。

【0020】

本発明の方法及び装置は、前記の運搬の前に、輸送チャンネル（又はチャンネル）を親水性増加化合物によって処理すると、うまく使用できることが経験的に見出された。本発明は、処理が行われる場合によって限定されることを、厳密には意図していない。確かに、幾つかの増加化合物の長期特性によって幾らかの柔軟性がある。

【0021】

本発明の方法及び装置は、マイクロチャンネル領域が疎水性試薬によって処理されて、疎水性領域を形成している場合に、うまく使用できることも、経験的に見出された。マイクロチャンネル中の一定の位置に規定された疎水性領域及び圧力供給源を使用することによって、正確にナノリットル容積の液体液滴（すなわち、マイクロ液滴）を分割することができ、マイクロチャンネルを通じてそれらの液滴の移動を制御できる。

【0022】

そのような疎水性領域（又は「疎水性区画（patches）」）を利用する1つの実施態様では、本発明は、(a)マイクロ液滴輸送チャンネル（又はマイクロ液滴輸送チャンネルを含む装置）を提供し、該チャンネルは、i)1以上の疎水性領域を有し、ii)気体供給源と連絡しており；(b) i)該チャンネル内に配置された液体マイクロ液滴供給源及びii)液体隣接疎水性領域を規定する該疎水性領域の1つで該液体が停止するような条件下に該チャンネル中に液体を導入し；そして(c)規定サイズ of のマイクロ液滴が、i)該液体隣接疎水性領域と接触し、そしてii)それを超えて移動するような条件下に該気体供給源からの気体を使用して該液体マイクロ液滴供給源から不連続液体量を分離することを含むマイクロ液滴の移動方法を意図している。

【0023】

1つの実施態様では、該気体供給源からの該気体は、該マイクロ液滴輸送チャンネルと連絡している気体取り入れ経路から該チャンネルに入り、該マイクロ液滴輸

送チャンネルとも連絡している気体通気孔から該チャンネルを出る。この実施態様では、（上記記載の方法の部分bで述べたように）液体のチャンネルへの導入はi)液体が気体取り入れ経路を通過し、ii)所望のサイズのマクロ液滴が、気体取り入れ経路と液体隣接疎水性領域との間の距離によって規定されるようになっているのが好ましい。この実施態様では、（上記方法の部分cで述べたように）気体の導入は、マクロ液滴を押し進め、i)液体隣接疎水性領域を通過させ、そしてii)（入るのではなく）気体通気孔のそばを通過させる。

【0024】

そのような疎水性領域（又は「疎水性区画」）を利用するもう1つの実施態様では、本発明は、(a)シリコン中にエッチングされたマクロ液滴輸送チャンネルを含む装置を提供し、該チャンネルは、i)1以上の疎水性領域を有し、そしてii)気体供給源と連絡しており；(b) i)該チャンネル内に配置された液体マクロ液滴の供給源及びii)液体隣接疎水性領域を規定する該疎水性領域の1つで該液体が停止するような条件下に該チャンネル中に該液体を導入し；そして(c)規定サイズのマクロ液滴が、i)該液体隣接疎水性領域と接触し、そしてii)それを超えて移動するような条件下に該気体供給源からの気体を使用して該液体マクロ液滴供給源から不連続液体量を分離することを含むマクロ液滴の移動方法を意図している。

【0025】

さらに、チャンネルの中の液体とシリコンチップのエレクトロニクスの上に液体バリアーが必要であることが経験的に見出された。好ましいバリアーは、一酸化珪素層、窒化珪素層、及び二酸化珪素層を含む。

【0026】

本発明はさらに、(a)第1のマクロ液滴及び第2のマクロ液滴、液体マクロ液滴配達手段、及び装置を提供すること、そして該装置は、i)シリコンからなるハウジング、ii)該シリコン中にエッチングされており、反応領域を含む第3輸送チャンネルを形成するために連結されている第1及び第2マクロ液滴輸送チャンネル、iii)該輸送チャンネルによって該反応領域と液体連絡しているマクロ液滴受容手段、及びiv)第1、第2及び第3輸送チャンネルに沿って配置されている

マイクロ液滴流方向付け手段を含む；(b)該第1液体マイクロ液滴を該マイクロ液滴配達手段によって該第1輸送チャンネルに配達すること；(c)該第2液体マイクロ液滴を該マイクロ液滴配達手段によって該第2輸送チャンネルに配達すること；及び(d)該輸送チャンネル中の該マイクロ液滴を該マイクロ液滴流方向付け手段によって該第3輸送チャンネル中の該反応領域に運搬すること、それによって第1及び第2マイクロ液滴を合併し、合併されたマイクロ液滴を作る、ことを含むマイクロ液滴を合併する方法を意図している。

【0027】

1つの実施態様においては、該第1マイクロ液滴は、核酸を含み、該第2マイクロ液滴は該核酸に作用し得るヌクレアーゼを含む。この実施態様においては、合併されたマイクロ液滴内での混合度を高めることが望ましい。これは多数の方法で達成できる。混合の1つの実施態様においては、工程(d)の運搬の後に、流動方向を逆転する。本発明は、逆転の性質又は回数によって制限されることを意図しない。該合併されたマイクロ液滴の流動方向の逆転が1回であっても、このプロセスは反応物の混合度を増加する。

【0028】

本発明は、多様なシリコン系マイクロ液滴輸送チャンネルを含む装置を意図している。1つの実施態様においては、装置は、i)シリコンからなるハウジング、ii)該シリコンにエッチングされたマイクロ液滴輸送チャンネル、iii)該輸送チャンネルを介して反応領域と液体連絡しているマイクロ液滴受容手段、及びiv)該輸送チャンネル及びマイクロ液滴流方向付け手段の間に配置された液体バリアーを含む。1つの実施態様においては、装置は2つの部分で組み立てられる。第1に、多くの形状にチャンネルがエッチングされる。第2に、この各要素を、エレクトロニクスを含むシリコン系チップと結合させる。これは、(第1要素における)カスタマイズ及び(第2要素における)標準化の両者を許す。

【0029】

本発明はまた、可融性材料によるチャンネルのシーリングのための装置及び方法を意図している。1つの実施態様においては、装置は、基板内に配置され、加熱素子と関連づけられた可融性材料を含む。

【0030】

1つの実施態様においては、本発明は、a)基板内に配置され加熱素子と関連づけられている可融性材料を有する装置を提供すること；そしてb)該可融性材料を少なくとも部分的に液化し、該基板を損傷しないように加熱素子によって該可融性材料を加熱することを含む方法を意図している。方法はさらに、c)液化された可融性材料を冷却させることを含む。本発明はチャンネルのサイズによって限定されないが、1つの実施態様においては、該基板はさらに、該基板内に配置されたマイクロ液滴チャンネルを含み、該可融性材料は、該マイクロ液滴チャンネル内に配置される。

【0031】

もう1つの実施態様においては、本発明は、a) i)基板内に配置された可融性材料、そして該可融性材料は加熱素子と関連づけられている；及びii)伸ばされたときに、該可融性材料に触れるように配置されたタイヤフラムを含む装置を提供すること；b)該可融性材料に触れるように該タイヤフラムを伸ばすこと；及びc)該可融性材料が少なくとも部分的に液化し、該基板が損傷されないように、該加熱素子によって該可融性材料を加熱することを含むチャンネル内での液体流動を制限する方法を意図している。1つの実施態様においては、方法はさらに、d)該可融性材料を冷却させることを含む。本発明は、チャンネルのサイズによって限定されないが、1つの実施態様においては、基板はさらに、該基板内に配置されたマイクロ液滴チャンネルを含み、該可融性材料は該マイクロ液滴チャンネル内に配置される。

【0032】

本発明はまた、a) i)側チャンネルに連結しており、基板内に配置された主チャンネル、ii)該側チャンネル内に配置され、加熱素子と関連づけられている可融性材料、及びiii)その適用が可融性材料の該側チャンネルから該主チャンネルへの流れを誘導するように側チャンネルに連結された移動手段を提供すること；b)該可融性材料が少なくとも部分的に液化するように可融性材料を加熱すること；及びc)該液化された可融性材料が、該側チャンネルから該主チャンネルに流れるように該移動手段を適用することを含む、チャンネル内での液体流動を制限す

る方法を意図している。本発明は、移動手段によって限定されないが、1つの実施態様においては、移動手段は強制空気 (forced air) である。1つの実施態様においては、方法はさらに、d) 該可融性材料を冷却させることを含む。本発明はチャンネルのサイズによって限定されないが、1つの実施態様においては、主チャンネル及び側チャンネルは、マイクロ液滴チャンネルである。

【0033】

本発明は基板の性質によって制限されないが、1つの実施態様においては、基板はシリコン又はガラスを含む。同様に、本発明は、可融性材料の組成によって制限されない。1つの実施態様においては、可融性材料ははんだ (solder) を含む。好ましい実施態様においては、はんだは、40:60の錫:鉛を含む。他の実施態様においては、可融性材料は、プラスチック、ポリマー及びワックスからなる群より選択される。同様に、本発明は、基板中の可融性材料の配置によって制限されない。もう1つの実施態様においては、可融性材料は、チャンネルに隣接して配置されるが、もう1つの実施態様においては、1つ以上のチャンネルの連結の近くに位置する。

【0034】

【定義】

以下の定義は、本明細書中で用いられる用語に対して与えられる。

【0035】

「生物学的反応」は、酵素 (例えば、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ等) 及び核酸 (RNA及びDNAの両者) などの生物分子を含む反応を意味する。生物学的サンプルは、タンパク質、脂質、核酸などの生物分子を含むものである。サンプルは、微生物 (例えば、細菌培養物) 由来又はヒト (例えば、血液、尿等) を含む動物由来であつてもよい。あるいは、サンプルは、精製 (例えば、抽出) 又は他の処理に付されていてもよい。生物学的反応は、装置とのある程度の生物適合性を要求する。すなわち、反応は理想的には、装置構成成分の特性又は性質によって実質的に阻害されるべきではない。

【0036】

「化学反応」は、無機化合物などの化学反応物を含む反応を意味する。

【0037】

「チャンネル」は、液体及び気体を移動させる媒体（例えば、シリコン）を通る経路（直線、湾曲、単一、複数、網状のいずれか）である。チャンネルはこのように、他の構成成分を結合させることができ、すなわち、構成成分を「連絡」させる、特に「流動（fluidic）連絡」させる、さらに特に「液体連絡」させる。このような構成成分は、これらに限定されないが、気体取り入れチャンネル及び通気孔を含む。

【0038】

「マイクロ液滴輸送チャンネル」は、「マイクロ液滴」に適合するように（ミクロンで）構成されたチャンネルである。本発明はチャンネルの正確な寸法又はマイクロ液滴の正確な容積によって制限されることを意図していないが、チャンネル及びマイクロ液滴の具体的な範囲は以下の通りである：チャンネルは、深さ0.5と50 μm の間（好ましくは5と20 μm の間）、幅20と1000 μm の間（好ましくは500 μm ）であることができ、そしてマイクロ液滴の容積は、（その長さから計算して）およそ0.01と100ナノリットルの間（より典型的には10と50の間）で変動し得る。

【0039】

「運搬」は、マイクロ液滴が輸送チャンネルを通過して反応領域などの特定の点に運搬される場合のように「通過して移動されること」を意味する。運搬は、流れ方向付け手段によって達成される。

【0040】

「流れ方向付け手段」は、それによって特定方向での液体（例えば、マイクロ液滴）の移動が達成されるいずれかの手段である。多様な流れ方向付け手段が意図されており、これに限定されないが、下記の「バブルポンプ」などのポンプを含む。好ましい方向付け手段は、不連続小滴が個別に加熱され、エッチングされたチャンネルを通過して推進される表面張力勾配機構を利用する。液体の連続的な流れのために、ポンプ（外部及び内部の両方）が意図されている。

【0041】

「バブルポンプ」は、流れ方向付け手段の1つの実施態様であり、液体がチャンネル中に導入され、該チャンネルは、その中に置かれた液体サンプルと接触す

るように配置された1つ以上の電極を含む。2つの電極を使用することができ、これら2つの電極の間に電位をかけることができる。電極の両端で、加水分解が起こり、泡が発生する。気泡は、電極がその液体に電氣的電荷をそそぎ込み続けるのに従って発生し続ける。膨張する泡は液滴の2つの側の間に異なる圧力を作り出し、ついには液体を前方へ押し、それをポリマーチャンネルを通して動かすのに十分に大きくなる。

【0042】

毛細管弁と結合されると、バブルポンプは、一定量の流動性 (fluidic) サンプルをチャンネルに沿って動かすことができる。毛細管弁は、本質的に、チャンネルの狭い部分である。作業においては、流動性サンプルは、先ず注入口貯蔵庫に注入される。液体を入れるやいなや、それは、毛細管力によってチャンネル中を移動する。次いで、液体はチャンネルの狭い部分を通過するが、チャンネルが再び広くなる端で止まる。流動性サンプルを入れた後、2つの電極間に電位をかける。電極の両端で、加水分解が起こり、泡が発生する。電極がその液体に電氣的電荷をそそぎ込み続けるのに従って、泡の発生が続く。次いで、膨張する泡は液滴の2つの側の間に異なる圧力を生じさせ、そしてついにはその圧力は液体を前方へ押すのに十分に大きくなる。

【0043】

バブルポンプと毛細管弁との組み合わせは、いかなる移動部品も必要とせず、容易に組み立てられる。さらに、装置は、泡の圧力に依存する、十分に制御された液体の動きを生じさせる。泡の圧力は、電極によって送り込まれる電荷量によって制御される。さらに、装置の電力消費も最少である。

【0044】

「親水性増加化合物」は、輸送チャンネルの親水性などの、構成成分の親水性を増進させる化合物又は調合剤である。定義は、構造的であるよりもむしろ機能的である。例えば、Rain-X(商標) 抗曇り剤は、エチルアルコール中にグリコール類及びシロキサン類を含む商業的に入手可能な試薬である。しかしながら、それが、ガラス又はシリコン表面をより親水性にするという事実は、試薬の特定構造よりも重要である。

【0045】

「疎水性試薬」は、チャンネル中の「疎水性被覆」を作るために使用する。本発明は、特定の疎水性試薬に限定されることを意図していない。1つの実施態様では、本発明は、酸化珪素表面に化学的にグラフトできる疎水性ポリマー分子を意図している。そのようなポリマー分子は、これに限定されないが、ポリジメチルシロキサンを含む。もう1つの実施態様では、本発明は、これらに限定されないが、ハロゲン化シラン類及びアルキルシラン類を含む、疎水性被覆を作るためのシラン類の使用を意図している。これに関して、本発明は、特定のシラン類に限定されることを意図しておらず、シランの選択は、機能的意義(sense) (すなわち、それが表面を疎水性にすること) においてのみ、限定される。

【0046】

1つの実施態様では、n-オクタデシルトリクロロシラン(OTS)を、疎水性試薬として使用する。もう1つの実施態様では、オクタデシルジメチルクロロシランを使用する。また、もう1つの実施態様では、本発明は、疎水性試薬として1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルトリクロロシラン(FDTS、 $C_{18}H_4F_{17}SiCl_3$)を意図している。さらに他の実施態様では、疎水性試薬として、フルオロアルキル、アミノアルキル、フェニル、ビニル、ビスシリルエタン及び3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン(MAOP)を意図している。そのような試薬(又はそれらの混合物)は、疎水性被覆を作るのに有用であり、そしてより好ましくは、チャンネル領域を疎水性にする(チャンネル全体の被覆とは異なる)のに有用である。

【0047】

本発明は、本発明の疎水性領域の特定の寸法に限定されることを意図していない。多様な寸法が可能であるが、領域は幅が約10と1000 μm の間(所望ならば、それを超える)であることが一般に好ましく、そしてより好ましくは、約100と500 μm の間である。

【0048】

水に対する前進接触角が、約70度よりも大きいとき、(チャンネル表面などの)表面は、「疎水性」である。1つの実施態様では、本発明の処理されたチャン

ネル表面は、水に対する前進接触角が約90及び約130度の間を示す。もう1つの実施態様では、処理されたマイクロチャンネルは、約130度を超える水に対する前進接触角を示す領域を有する。

【0049】

「液体隣接 (liquid-abutting) 疎水性領域」は、液体 (例えば、水性液体) を停止させるか、又はチャンネルの下流へのさらなる移動をブロックする、チャンネル内の疎水性領域であり、該停止又はブロックは、領域の疎水性に基づくものであり、該停止された、又はブロックされた液体は、直ちに、該疎水性領域の隣へ置かれる。

【0050】

「反応を開始する」は、反応を起こさせることを意味する。反応は、幾つかの手段によって開始され得る (例えば、熱、光の波長、触媒の添加等)。

【0051】

「液体バリアー」又は「水分バリアー」は、短絡及び／又はエレクトロニクス要素に損傷を与えることを防止する (例えば、アルミニウム加熱素子の破壊を防ぐ)、存在する構造上の幾つかの構造又は処理プロセスである。本発明の1つの実施態様においては、液体バリアーは、一酸化珪素層、窒化珪素層、及び二酸化珪素層を含む。

【0052】

「合併する」は、「混合する」とは異なる。第1及び第2マイクロ液滴が合併し、合併されたマイクロ液滴を形成する場合、液体は混合されてもよく、又は混合されなくてもよい。さらに、合併されたマイクロ液滴中での混合の程度は、これに限定されないが、合併されたマイクロ液滴の流動方向を逆転することを含む、本発明によって意図されている多様な技術によって増大され得る。

【0053】

「核酸増幅」は、核酸の濃度、特に、核酸の特定の断片 (piece) の濃度を増大させることを含む。好ましい技術は、「ポリメラーゼ連鎖反応」として知られている。参照によって本明細書に組み入れられるMullisらによる、米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号は、クローニング又は精製無しでゲノムDNAの混合

物中の標的配列のセグメントの濃度を増大する方法を記載している。この標的配列を増幅するプロセスは、2つのオリゴヌクレオチドプライマーのモル過剰量を所望の標的配列を含むDNA混合物に導入することからなる。2つのプライマーは、2本鎖配列のそれらのそれぞれの鎖に相補的である。混合物は、変性され、そしてハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションに続き、プライマーは、相補鎖を形成するようにポリメラーゼによって伸長される。変性、ハイブリダイゼーション、及びポリメラーゼ伸長の工程は、所望の標的配列のセグメントの比較的高い濃度を得るために必要とされる回数だけ繰り返すことができる。所望の標的配列のセグメントの長さは、互いに関してプライマーの相対的位置によって決定され、それ故、この長さは制御可能なパラメーターである。プロセスの繰り返しの局面 (aspect) なので、方法は、「ポリメラーゼ連鎖反応」(以下、PCRという) として発明者によって言及される。標的配列の所望のセグメントは、混合物中で(濃度の点から) 優性配列になるので、それらは「PCR」増幅されたと言われる。

【0054】

本明細書中で用いられる「基板」は、チャンネル及びマイクロ液滴輸送チャンネルを含むことができる素材をいう。例としては、これらに限定されないが、シリコン及びガラスが含まれる。

【0055】

本明細書中で用いられる「可融性材料」は、周囲温度で少なくとも半固体(好ましくは完全に固体)であり、周囲温度より高い温度に加熱されたときに液化し、冷却されたときに少なくとも部分的に再固化する素材をいう。好ましくは、可融性材料は、基板が損傷されない温度で少なくとも部分的に液化する。すなわち、可融性材料が液化する温度では、基板及び基板中の他の金属が液化せず(実施例6で述べるように容易に試験される)、その特性を変化させない。「特性を変化させる」ことによって、基板又は金属はその構造的無傷を維持し、その伝導性を変化させず、液化しないことを意味する。このように、融解し得るという性質は、特定の融点と必ずしも関係しない。例としては、これらに限定されないが、はんだ、ワックス、ポリマー及びプラスチックが含まれる。

【0056】

本明細書中で用いられる「はんだ」は、可融性材料である金属又は合金をいう。好ましくは、はんだは、参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第4,967,950号中に記載されているような低温はんだである。「低温はんだ」は、共融合金を意味する。本発明は特定のはんだに限定されないが、1つの好ましいペーセントのはんだ組成物は、スズ：鉛の63:37の共融合金である。もう1つの適合し得るはんだは、スズ：鉛：銀の63:35:2の共融合金を有する90%金属組成物である。他の所望のはんだ組成物は共融鉛：スズ、鉛：インジウム、鉛：インジウム：スズ等である。

【0057】

本明細書中で用いられる「加熱素子」は、可融性材料を少なくとも部分的に液化し得る要素をいう。可融性材料は、加熱素子が可融性材料を少なくとも部分的に融解できるように、それが加熱素子の近くにあるとき、加熱素子に「関連づけられている」。必要な近接は、可融性材料の融解特性並びに加熱素子の加熱能力に依存するだろう。加熱素子は、可融性材料と同じ基板内に含まれていてもよく、含まれていなくてもよい。

【0058】

本明細書中で用いられる「タイヤフラム」は、それが（伸ばされた）1つの位置でチャンネル中の液体の通過を少なくとも部分的に塞ぐことができ、もう1つの位置でチャンネル中の液体を流動させることができるように巧に扱われ得る要素をいう。「作動力」は、タイヤフラムを伸ばし得る力である。「弁座」は、伸ばされたときにタイヤフラムの一部を受け入れるように設計された構成要素である。「移動手段」は、液化された可融性材料を移動し得る手段である（例えば、強制空気、磁場等）。

【0059】

「液体マイクロ液滴の供給源」は、マイクロ液滴が作られ得る液体供給源である。そのような供給源は、これらに限定されないが、液体の連続的流れ並びに静止供給源（貯蔵器中の液体など）を含む。好ましい実施態様では、液体マイクロ液滴の供給源は、不連続サイズ of マイクロ液滴が分割されるマイクロチャンネル中の液体を

含む。

【0060】

【発明の説明】

本発明は、マイクロ加工及びマイクロ加工された装置における生物学的反応、特に、マイクロチャンネルを通過するマイクロ液滴中の生物学的サンプルの移動及び混合に関する。発明の説明は、I) (マイクロ液滴輸送チャンネル、反応容器、電気泳動ポート、及び放射線検出器を含む) シリコン及びガラス基板を用いたミクروسケール装置の設計、II) 不連続サイズのマイクロ液滴の生成 (又は規定)、III) 不連続マイクロ液滴が個別に加熱され、エッチングされたチャンネルを通過して推進される表面張力勾配機構を用いた不連続マイクロ液滴の移動、IV) シール弁による流れ制御、及びV) 反応のための生物学的サンプルの混合を含む。

I. ミクروسケール装置の設計

構成された流体素子 (fluidic) 系の構築のための多くの構成、素材、及びサイズスケールがあるが、本発明は、コスト有効性解決策 (cost-effective solution) としてシリコンマイクロ成形された装置を意図している。シリコンは、コンピュータ計算マイクロプロセッサの構築に用いられる素材であり、その加工技術は過去30年に亘り先例のない速度で発展してきた。この技術は、初期にはマイクロエレクトロニクス装置を作るために適用されたが、同じ技術が、現在ではマイクロ機械的システムに用いられている。

【0061】

連続的な流動液体輸送は、シリコンによって発展したマイクロ液体装置を用いて報告されてきた。J. Pfahlerら、Sensors and Actuators, A21-A23 (1990), pp. 431-434参照。ポンプもまた、流れを作る外部の力を用いて、シリコンのマイクロ機械加工に基づいて報告されてきた。H. T. G. Van Lintelら、Sensors and Actuators 15:153-167 (1988)参照。対照的に、本発明は、内部の力を用いて (すなわち、ポンプによって作り出される外部の力の使用と対照的に)、シリコン中の不連続小滴輸送 (すなわち、連続的な流動と対照的に) を採用する。

【0062】

機械的な建築素材として、シリコンは周知の工作特性を有する。シリコン装置

の経済的魅力は、それらの関係するマイクロ機械加工技術が、本質的に、写真による複製技術であることである。これらのプロセスにおいては、透明なテンプレート又は不透明なデザインを含むマスクを用いて、シリコン基板の表面上に物を写真定義する (photodefine)。テンプレート上のパターンは、コンピューター補助による設計プログラムによって作成され、1 ミクロン未満の線幅の構造の輪郭を描くことができる。一旦テンプレートが作成されれば、同一複製構造を加工するために、ほぼ無期限に使用できる。つまり、全ての構成成分がシリコンマイクロ機械加工プロセスに適合し得る場合には、極端に複雑なマイクロ機械加工でさえ、多量に、低い増加単位コストで、複製され得る。ガラス又は石英などの他の基板は、マイクロ加工された分析装置を構築するために写真平板法を用いることができるが、同一構造物内で加工されるエレクトロニクス構成成分の広い多様性を許すという付加された利点を与えるのはシリコンだけである。

【0063】

1つの実施態様においては、本発明は、図1に図式によって特定されている要素を含む、統合された分析系におけるシリコン製のマイクロ機械加工された構成要素を意図している。この提案された形態においては、サンプル及び試薬はエントリーポート(A)を通して装置に注入され、それらはチャンネル(B)を通して、混合及び反応(例えば、制限酵素消化又は核酸増幅)が起きる熱制御反応器(C)などの、反応チャンバーへ不連続小滴として輸送される。生化学的産物は、次いで同じ方法によって電気泳動モジュール(D)に移動され、そこで移動データは検出器(E)によって集められ、(示されていない)記録計器へ送られる。重要なことは、液体及びエレクトロニクス構成成分が、機能及び構成において生物学的反応及び試薬と十分に適合するように設計されていることである。

【0064】

シリコン機械加工においては、閉鎖されたチャンネルを形成する簡単な技術は、基板の表面上に解放くぼみ(open trough)をエッチングすること、及び次いで解放チャンネルの上に第2のエッチングされていない基板を結合することを含む。輪郭のはっきりした側壁及び均一なエッチング深さを有するチャンネルを加工できる、広く多様な等方性及び異方性の、液体又はガスのいずれかのエッチン

グ試薬がある。チャンネルの進路は、写真プロセスマスクによって限定されるので、装置上のチャンネルパターンの複雑さは事実上無制限である。制御されたエッチングは、基板を通して完全に通ったサンプルエントリー穴も加工でき、チャンネル構造に連結された装置の外側表面上のエントリーポートとなる。

【0065】

図2は、構成の2部材によるアプローチを示す。マイクロチャンネル(100)は、シリコン基板(200)中に作られており、該構造体はガラス基板(300)に結合されている。2部チャンネル構築技術は、調整及び結合プロセスを必要とするが、多様な基板及びチャンネル輪郭を受け入れやすい。言い換えれば、加工目的のためには、2部アプローチは1つの要素（すなわち、チャンネル及び反応構成を有するシリコン）のカスタマイズ及び、例えば、標準電気パッド(400)を含む、標準化された（非カスタマイズ化）第2要素との結合を可能にする。

I I. ミクロ液滴の生成

本発明は、不連続（すなわち、制御され、予め決められた）サイズのマクロ液滴の生成のための方法、構成物（compositions）及び装置を意図している。本発明は、液体サンプル注入及び弁の使用を必要としない移動システムを発展させるための選択的疎水性被覆の使用を意図している。1つの実施態様では、本発明は、ガラス、石英及び珪素基板上に疎水性領域及び親水性領域をパターン化するための、i)金属層によってパターン化された酸化珪素表面上への（OTSからなる自己集成（self-assembled）単層フィルムなどの）疎水性試薬の付着（deposition）及びii)続く金属の除去によって疎水性パターンを与えることを含む、リフトオフ（lift-off）方法を意図している。プラスチックなどの他の基板も、酸化珪素のthinフィルムの付着又はスピナーオンガラス法（spin-on-glass）によって使用できる。

【0066】

疎水性表面をパターン化する前記研究は、そのような単層フィルムの光付着（photocleaving）によってなされてきた。光付着法は、深紫外線（Deep-UV）暴露を使用し、単層の分子を疎水性にする。これに対して、本発明は、高出力紫外線供給源の使用を必要としない方法を意図しており、むしろ、本発明の好ましい方

法は、単純なマイクロ加工方法を用いる。

【0067】

表面（例えば、マイクロ液滴輸送チャンネルの表面）の適当な疎水性パターン化に続き、本発明は、平らな表面上のパターンを被うパターン化されエッチングされたガラスキャップ（cap）の配置を意図している。次いで、このようにして形成された疎水性／親水性チャンネルは、正確なナノリットル容積の液体サンプルを移動するのに使用できる。

【0068】

図3は、ナノリットル容積の液体サンプルを分割し、外部の空気を使用してそれを移動する装置（10）の1つの実施態様の模式図を示し、該装置は、複数の疎水性領域を有する。図3Aを見ると、注入口（20）に置かれた液体（濃い黒で示す）は、表面力（surface forces）によって引っぱられ、チャンネル中の液体隣接疎水性領域（40）で停止し、あふれ分（overflow）は、あふれチャンネル及びあふれ分放出口（30）によって処理される。図3Aに示す実施態様では、液体の前部は、（入るのではなく）チャンネルと流動連絡している気体取り入れ経路（50）によって移動され、液体隣接疎水性領域（40）が、液体を規定の位置に動かす。次いで、気体供給源からの気体（例えば、外部空気供給源及び／又はポンプからの空気）が、長さ「L」のマイクロ液滴に分割するために注入される（図3B、下の矢印）。分割されたマイクロ液滴（60）の容積は、予め決められており、長さ「L」及びチャンネルの横断面に依存する。注入口側へ作用する（from acting towards）気体（例えば、空気）の圧力を妨げるためには、注入口（20）及びあふれポート（ports）（30）を、ブロックするか、又は過剰の水を注入して流れに対する抵抗を増すことができる。

【0069】

パターン化された表面を使用して、液滴の動きを制御することもできる。チャンネルのさらに下流に疎水性気体通気孔（70）を配置することによって、通気孔（70）を超えて移動した液体マイクロ液滴（60）を停止させることができる。液滴（60）が通気孔（70）を通過すると、空気が通気孔（70）から外へ出て、それ以上液滴を押すことはないだろう。

【0070】

通気孔（70）をブロックすることによって、再度液滴（60）の移動を開始できる。疎水性空気圧ライン（示されていない）、疎水性通気孔並びに通気孔の戦略的（strategic）開口及び／又は閉鎖の組み合わせを使用することによって、液体液滴を前後に動かして混合することができるか、又は加熱、反応及び／又は分離などの作業を行うために、チャンネル網中の正確な位置に液滴を動かすことができる。

【0071】

外部空気の使用に加えて、内部発生空気圧を使用して液滴を分割し移動することもできる。図4は、内部気体（例えば、空気）圧力発生器（generation）を使用してマイクロ液滴を分割（例えば、規定）し、移動し及び停止させるための、本発明の装置（110）の1つの実施態様の模式図を示し、該装置は、複数の疎水性領域を有する。図4Aを見ると、注入口（120）に配置された液体（濃い黒で示す）は、表面力によって引っ張られ、チャンネル中の液体隣接疎水性領域（140）で停止し、あふれ分（overflow）は、あふれチャンネル及びあふれ分放出口（30）によって処理される。図4Aに示される実施態様では、液体の前面は、（入るのではなく）チャンネルと流動連絡されている気体取り込み経路（150）によって移動する。気体取り込み経路（150）を介してマイクロ液滴輸送チャンネルと流動連絡しているチャンバー（180）内部にトラップされた空気を加熱することによって、高められた圧力を発生させることができる。容積Vのチャンバー内部の圧力増加の大きさは、温度上昇に関係し、理想気体の関係式（relation）によって見積もることができる。

【0072】

気体（例えば、空気）の温度上昇は、チャンバー内部に圧力を発生させ、その圧力が十分高くなり、液滴（160）を分割し、液滴が液体隣接疎水性領域（140）を超えて移動するのに十分高くなるまで上昇するだろう。膨張した空気が液体を加熱する問題を回避するために、チャンバーを輸送チャンネルから距離をおいて配置することができる。さらに、空気チャンバー内部にヒーターを吊すか、又はそれらを薄い絶縁膜上に配置することによって、混線を回避するだけでなく、最

少の電力消費となるだろう。

【0073】

構成物及び方法は、これらに限定されないが、チャンネル面積 $40\mu\text{m}$ から $500\mu\text{m}$ に対し、チャンバー容積が 0.24mm^3 から 0.8mm^3 を有する装置を含む、多様な設計及び寸法を有する装置に好適である。液滴分割及び移動は、4.5ボルトから7.5ボルトの間の電圧（ヒーターの抵抗は、9.5オームから11オームの間で変化する）を使用して1から3秒で起こる。液体分割のサイズは、約25と約50ナノリットルの間であり、チャンネル設計のために使用される「L」値に依存する。ヒーターを作動させておくと、マイクロ液滴はほぼチャンネルの末端まで移動を続け（距離約12.5 mm）；その時間は、ヒーターにかけられる電圧及びチャンバーの容積に依存する。液滴の移動の開始は、より小さなチャンバーを有する装置の作動ほどより早く起きる。正確な機構の理解は本発明をうまく実施するのに必要ではないが、チャンバーが小さければ小さいほど、容積が小さくなり、より高い圧力値が、より早く達成される。ヒーター付近は、RTDで測定して最高温度約 70°C に達する。

III. 不連続マイクロ液滴の移動

本発明は、シリコン中の不連続小滴中の液体サンプルの制御された移動を記載する。不連続小滴輸送は、液体を所望の場所に輸送するための囲まれたチャンネル又はチューブを用いるシステムを含む（図1、B）。チャンネル内では、不連続液体試薬マイクロ液滴が、注入され、測定され、生化学的分析構成成分の間を移動され得る。不連続小滴移動は、3つの利点を有する。第1に、各サンプル小滴は、全ての他のものから分離されており、汚染の危険が減少する。第2に、均一なチャンネル中では、各サンプルの容積は、単に小滴の長さを測定することによって決定できる。第3に、これらの小滴の移動は、簡単な加熱（例えば、内部の力を用い、移動部品無しで）によって達成され得る。移動は、小滴の前面又は後面での界面張力を変化させる熱勾配を用いて行われ、このようにして、小滴を横切る圧力差を作り出す（図5）。例えば、親水性チャンネル内の小滴は、後界面を加熱することによって前方へ推進され得る。温度の局所的な上昇は、小滴の後面の表面張力を減少させ、それ故、界面圧力差が減少する。減少した圧力差は、

小滴のその末端の局所内部圧の増加 (P_1 増加) に対応している。2つの小滴の界面は、 P_1 が P_2 よりも大きく、もはや平衡ではなくなり、圧力差が小滴を前方に推進させる。

【0074】

すなわち、前方移動は、チャンネルに沿って続くヒーターによって小滴の後面を加熱し続けることによって維持でき、一方、前面の加熱は、小滴の移動を逆転するのに使用できる。チャンネルの下に金属線に電圧をかけることで、小滴の縁の下に熱が発生する。左界面の加熱は、小滴のその末端の内部圧を増加し、小滴全体を右へ押し進める。小滴の内部の圧力は、大気圧 P_{atm} 、表面張力 σ 、及びチャンネルの寸法を知るによって計算できる。円形の断面に対して、内部圧 P_i は、 $P_i = P_{atm} - (4\sigma \cos \theta) / d$ (ここで d はチャンネルの直径であり、 θ は接触角である) によって与えられる。 σ は温度の相関的要素 ($\sigma = \sigma_0 (1 - bT)$ (ここで σ_0 及び b は正の定数であり、 T は温度である)) なので、小滴の左末端の温度の上昇は、表面張力を低下させ、それ故その末端の内部圧を増加させる。そして、2つの末端の間の圧力差は、より低い圧力の方へ (すなわち、右へ) 小滴を押して動かす。示された水性小滴は、親水性チャンネル ($0 < \theta < 90$) の中にあり；疎水性チャンネル ($90 < \theta < 180$) に対して、右端を加熱することによって小滴を右へ移動させる。

【0075】

接触角ヒステリシス (小滴の前進端の接触角は、後退端の接触角よりも大きい) は、移動が起きる前に最少の温度差を要求する。移動が始まった後の小滴の速度は、式 $v = AEPd^2 / 32\mu L$ (ここで AEP は圧力差であり、 μ は溶液の粘度であり、 L は小滴の長さである) を用いて概算できる。本発明は、移動を起こす 30°C を超える温度差を意図している。チャンネル全体に沿って配置された温度センサーを用いた実験は、小滴にわたる約 40°C の差は、移動を与えるのに十分であることを示している。これらの実験においては、チャンネルの断面は、 $20\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ であり、これらの小滴のそれぞれの容積はそれらの長さから計算でき、長さ 1cm の小滴で、約 100 ナノリットルである。

I V. シールされた弁による流動制御

本発明は、液体流動をコントロールするためのシールされた弁の使用を意図している。本発明は特定のシール方法に限定されないが、1つの実施態様においては、作動力はタイヤフラムを弁座に押しつけて液体流動を制限し、そして、タイヤフラムは弁座にシールされる。そのような実施態様においては、はんだパッドは、はんだを融解できる加熱素子と関連づけられている。この液化されたはんだは、弁座及びタイヤフラムの領域を超えて流れ、タイヤフラムと弁座の間の汚染、割れ目及び曲がりを覆う。タイヤフラムと弁座を動かずに一緒に保持する作動力によって、加熱素子が停止されて、はんだを冷却し、再固化させる。固化の際、作動力は解放されることができ、弁がシールされる。再度弁を開くには、はんだは作動力を適用すること無しに液化され得る。

【0076】

好ましい実施態様においては、はんだパッドがタイヤフラム又は弁座上に配置されるように弁が設計されている。本発明はこれらのはんだパッドの正確な配置方法に限定されないが、それらが電気メッキされ得ることが、特に意図されている。

V. 反応における生物学的サンプルの混合

小滴の移動（上記に一般的に記載した）は、通路中の1つの工程として意図されている。他の工程は、サンプル混合及び制御された反応を典型的に含む。例えば、小滴移動に用いられるチャンネルの全表面に沿って配置された一体型ヒーターもまた、チャンネル部位が熱反応チャンバーとして使用されるようにする。反応の前のサンプル混合のために、Yチャンネル装置が意図されている（図6A）。そのような装置においては、第1のサンプル（例えば、核酸）を含む第1の小滴は、Yチャンネル装置の1つのチャンネルに沿って移動され、第2のサンプル（例えば、消化バッファー中の制限消化酵素）を含む第2の小滴は、Yチャンネル装置の他方のチャンネルに沿って移動される（図6B及び6C）。

【0077】

サンプル合併（図6D）に引き続いて、合併されたサンプルが適切に混合されなかったという懸念がある。すなわち、もし2つの同様のマイクロ液滴が、同じ流動速度の層流の単一のチャンネルに入るならば、それらは軸方向に均一な小滴を

形成するだろうが、幅方向には混合されないだろう。幅方向混合は、多数の方法で達成できる。

【0078】

第1に、大きなDNA分子に対してであるが、単純拡散があり、この混合の特有の時間は、数時間又はそれ以上のオーダーである。移動及び加熱の間の小滴内部で生じる循環パターンは、この時間を顕著に減少させる。この点に関して、本発明は、一体型ヒーター及び温度センサーを用いて、加熱された混合物（例えば、65℃で10分間温度を維持）として混合物を維持することを意図している。

【0079】

第2に、本発明は、チャンネル内の比較的短い距離に亘り混合物の流れ方向を逆転することによる混合を意図している。多様な逆転アプローチが可能であるが、約2つの小滴長さを含む距離に亘る1方向又は2方向の変化が、適当であることが見出された。

【0080】

最後に、混合物が物理的障害物に対して又はそれを超えて移動される混合アプローチがある。例えば、混合物は、Yチャンネルの合併点に対して後ろに「衝突」するか、又はチャンネル中の故意の欠陥 (deliberate imperfections) を越えて単に移動（すなわち、「ローラーコースター」混合）され得る。

【0081】

良好な混合は、もちろん、反応由来の生成物の特性によって確認され得る。生成物が検出される場合、混合は少なくとも部分的に良好であった。本発明は、1つの実施態様においては、生成物形成を確認するために電気泳動の使用を意図している。

【0082】

【好ましい態様の説明】

好ましい態様の説明には：I) シリコンベースの装置を加工するためのマイクロ加工技術；II) 最適流動及び再現性のためのチャンネル処理；及びIII) 構成部品の設計（特に、電気泳動モジュール及び放射線検出器）が含まれる。

【0083】

I. シリコンベースの装置のマイクロ加工

従来認められているように、シリコンには公知の加工特性及び関連する写真複製技術がある。半導体集積回路を加工するための主な近代的方法はいわゆるプレーナー・プロセスである。このプレーナー・プロセスはシリコン独自の特性を頼みとし、シリコン基板に“積層”集積回路装置を加工するために堆積、酸化、フォトリソグラフィ、拡散及び／又はイオン注入、及び金属被覆を含む複雑な加工工程列を含む。例えば、W. Miller、米国特許第5,091,328号を参照のこと。これは参照することによりここに組み込まれる。

【0084】

例えば、結晶シリコン基板の酸化により基板表面上に二酸化ケイ素の層が形成される。次に、フォトリソグラフィを用いて二酸化ケイ素層に選択的にパターンを形成してエッチングし、下層をなす基板の一部を露出させることができる。これらの二酸化ケイ素層の開口部は、下層をなすシリコンの限定された領域へのイオン（“ドーパント”）の導入（“ドーピング”）を考慮したものである。二酸化ケイ素はマスクとして機能する；すなわち、ドーピングは開口が存在するところでのみ生じる。ドーピングプロセス及びドーパントの型を注意深く制御することでシリコンに異なる電気抵抗を有する局在化領域を創出することができる。主としてアクセプタイオンをドーパした（正フリーホール、“p”）領域及びドナーイオンをドーパした（陰自由電子、“n”）領域の特定の配置により、シリコンウェハ上でのトランジスタ、抵抗、キャパシタ及び他の回路要素の相互に関連した設計が決定される。電気的な相互接続及び集積回路を構成する様々なp又はn領域への接触は導電性材料、通常はアルミニウム又はポリシリコンの薄膜の堆積によって形成し、それにより集積回路の設計を完成させる。

【0085】

もちろん、用いられる特定の加工プロセス及びその順列は装置の所望の特性に依存する。今日では、多様な装置及び回路の中から選択して所望のデジタル又はアナログ論理機能を実行することができる。

【0086】

好ましい態様においては、標準的な水溶液ベースのエッチング手順を用いて、

500 μ 厚ガラスウェハ (Dow Corning 7740) 上にチャンネルを作製した。初期ガラス表面を洗浄し、2層の電子ビーム蒸発金属を付着させた (20nmクロム、次いで50nm金)。フォトレジストMicroposit 1813 (Shipley Co.) を4000rpm、30秒で塗布した；ガラスマスク1を用いてパターンを形成し、現像した。金属層をクロム腐蝕液 (Cr-14, Cyantec Inc.) 及び金腐蝕液 (Gold Etchant TFA, Transene Co.) で、ガラス表面にパターンが明瞭に視認できるまでエッチングした。次に、接近可能なガラスをフッ化水素酸及び水 (1:1、v/v) でエッチングした。エッチング速度は、試験ウェハを用いて、典型的には20ないし30 μ mのチャンネル深さをもたらす最終エッチングで見積もった。各々のウェハについて、完成したチャンネルの深さを粗面計を用いて測定した。最終ストリッピング (PRS-2000, J.T.Baker) により残留するフォトレジスト材料及び被覆金属の両者を除去した。

【0087】

態様の1つにおいては、上述の方法でガラス上にエッチングしたチャンネルを、光学的接着剤 (SK-9 Lens Bond, Sumers Laboratories, Fort Washington, PA) を用いて、二部構成アプローチでヒーター・エレメント・ウェハ (heater-element wafer) に接合した。接着剤を紫外線源 (365nm) の下で12ないし24時間硬化させた。

【0088】

本発明者らが設計した最初の装置は1層のシリコンを含んでいた。しかしながら、チャンネル内の (不可避の) ミクロ液滴 (下記実験を参照) のため、経験上、これらは短絡を防止するには不適切である。好ましい設計は3層の酸化物を含む。ナノリットルの液滴を移動させて混合することが可能なそのような好ましい装置は、平坦シリコン基板をガラスカバーにエッチングされたチャンネルに接合することにより構築した。一連の金属ヒーターをシリコン基板上に、1つのレーン (“Y” 形状) に合体する2つの平行なレーンとして嵌合した (図7A)。この加熱素子の形成は、まずウェハをサーマル二酸化ケイ素 (thermal silicon dioxide) の1.0 μ mの層で被覆することにより行った。次に、深さ0.35 μ m、幅5 μ mの溝を、被覆フォトレジストに設定されたパターンに従い、二酸化ケイ素にリアクテ

イブ・イオン・エッチング (RIE) した。アルミニウムを電子ビーム蒸発を用いてウェハ全体にわたって蒸着し、その金属層をストリッピング液を用いて無傷のフォトレジストを有する全ての表面から“リフト・オフ (lifted-off)” した。この金属嵌合プロセスにより比較的平坦な表面が得られ、溶液不浸透性バリア層を堆積させるための均一な基体が得られる。このバリア層は一連の3回のプラズマ増強化学蒸着 (PECVD) によって作製した： $1.0\mu\text{m}$ の二酸化ケイ素 (SiO_2)、 $0.25\mu\text{m}$ の窒化ケイ素 (Si_3N_4)、及び $1.0\mu\text{m}$ の二酸化ケイ素 (SiO_2) (図7B)。幾つかの加熱素子も抵抗温度センサーとして用いた。

【0089】

ヒーター素子は以下の通りに作製した。シリコンウェハ (p型、 $18-22.5\text{ cm}$ 、 $\langle 100 \rangle$ 、ホウ素濃度 10^{15} cm^{-3}) を、 SiO_2 サーマル酸化物 ($1.0\mu\text{m}$) を成長させるための基板として用いた；フォトレジスト (AZ-5214-E、Hoescht-Celanese) を塗布し、 3000 rpm で30秒回転させた。レジストにパターンを形成し (金属1)、現像した。リアクティブ・イオン・エッチング (RIE、Plasma Thermal, Inc.) を、以下の条件で、 SiO_2 層に $0.35\mu\text{m}$ の深さまで行った： CHF_3 、 15 sccm (立方センチメートル毎秒)； CF_4 、 15 sccm ； 4 m トル；DCバイアス電圧 200V 、 100W 、20分。エッチング深さを粗面計で測定し、 $0.35\mu\text{m}$ の金属アルミニウムを電子ビーム蒸着した。レジスト及び被覆金属を、溶液状Microposit 1112A除去剤 (Shipley Co.) を用いる現像によってリフト・オフした。バリア層は、プラズマ増強化学蒸着 (PECVD) を用いて連続的に蒸着した $1\mu\text{m}$ SiO_2 、 $0.25\mu\text{m}$ Si_3N_4 、及び $1\mu\text{m}$ SiO_2 からなる。第2マスクを用いる金属層へのコンタクト・ホールのエッチングにRIEを用いた (CHF_3 、 15 sccm ； CF_4 、 15 sccm ； 4 m トル；及びDCバイアス電圧 200V 、 100W 、 120分)。

【0090】

図7に示されるように、これらの素子を、1つのレーンにまとまる各々 $500\mu\text{m}$ 幅の2つの平行なレーンとして配置する。個々のヒーターはこの $500\mu\text{m}$ 幅の領域を横断するアルミニウムワイヤ ($5\mu\text{m}$) 対からなる。これらの素子のいずれの側の広範な金属領域も外部回路に接続するための接合位置である。アルミニウム素子の幅は $5\mu\text{m}$ である。図7Cのチャンネルは図7Aの加熱素子レーンと同一の幅及びデ

ザイン形状を有し、 $500\mu\text{m}$ の幅及び約 $20\mu\text{m}$ の深さで均一にエッチングされている。

【0091】

この加熱素子ウェハを、同じ“Y”形式でチャンネルがエッチングされているガラスウェハに接合した。濃フッ化水素酸の水性化学エッチングを用いて定義された側壁及び均一な深さを有するチャンネルを加工した。エッチングされるチャンネルはクロム／金マスクによって定義され、幅 $500\mu\text{m}$ 及び深さ約 $20\mu\text{m}$ である。互いに補足し合うシリコンヒーター及びガラスチャンネルウェハをそろえて並べ、次に接着剤で接合して完成装置を形成した。

【0092】

温度センサーとして用いられる加熱素子の各々を、好ましくは最初に、一定電圧の下、 22°C 及び 65°C で電気抵抗を測定することにより較正する；中間温度は線形補間により見積もる。

【0093】

II. チャンネル処理

ミクロ液滴の運動及び生物学的反応を行う前に、好ましくは、これらのチャンネルを塩基、酸、バッファ、水及び親水性増強化合物、次いで比較的高濃度の非特異的タンパク質の溶液で洗浄することにより処理する。好ましい態様においては、チャンネルを各々約 $100\mu\text{l}$ の以下の溶液で連続的に洗浄する； 0.1N NaOH ； 0.1N HCl ； 10mM トリス-HCl (pH 8.0)、脱イオン化 H_2O 、Rain-X Anti-Fog (Unelko Corp.、Scottsdale、AZから購入可能な親水性増強化合物)、及び $500\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ウシ血清アルブミン (GIBCO-BRLから反応酵素グレードで購入可能な非特異的タンパク質)。ウェハをステレオスコープのステージ (Olympus SZ1145) 上に置き、加熱素子用のコンタクト・パッドを安定化した電源に接続した。約30ボルトを素子を通して短パルスで印加することにより加熱が生じ、液滴の移動速度を測定した。各々の実験において、通常は30%未満の、蒸発による液滴体積の検出可能な減少が認められた。液滴の移動をHamamatsuビデオカメラを用いてビデオテープに記録した。

【0094】

III. 疎水性領域のチャンネル処理

本発明の装置の一態様（図8A）においては、装置は、ヒーター（891）、コンタクト・パッド（892）及び抵抗温度検出器（893）を有するシリコン基板（810B）に接合されたガラス・トップ（810A）を含む。そのガラス側にはそこにエッチングされたチャンネル及びチャンバがある。図8Aには導入口（820）及びオーバーフロー（830）口、通気孔（870）及び気体チャンバ（880）が示されている。

ヒーター及び抵抗温度検出器

ヒーター及び温度検出器（図8B）の製造プロセスは、シリコンウェハ（p型、 $1.8-2.2 \text{ } \mu\text{m}$ 、ホウ素濃度 $\sim 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ ）を SiO_2 サーマル酸化物（ $1 \text{ } \mu\text{m}$ ）を成長させるための基板として用いることによって開始する（工程1）。 $0.5 \text{ } \mu\text{m}$ の金属アルミニウム膜を電子ビーム蒸着させる。フォトレジストPR1827を塗布して4000 rpmで30秒間回転させ、パターン形成（金属1）して現像する。露出したアルミニウムをアルミニウム腐蝕液でエッチングし、フォトレジストを剥離させて金属ヒーターを定義する（工程2）。

【0095】

フォトレジストを再度回転させ、第2のリソグラフィーを行う（金属2）。 $0.15 \text{ } \mu\text{m}$ の白金（“Pt”）層を電子ビーム蒸着する。 $0.03 \text{ } \mu\text{m}$ 厚のチタン金属層（電子ビーム蒸着）を接着層として用いる。レジスト及びオーバーレイ金属を、溶液状のMicroposit 1112Aリムーバ（Shipley Co.）を用いる現像によってリフト・オフする。この白金金属を抵抗熱検出器として用いる。次に、ケイ素の低温度酸化物（LT0）を $0.7 \text{ } \mu\text{m}$ 堆積させ、遮蔽層及び親水性（hydrophilic）気体として作用させる（工程4）。第3のリソグラフィーを行い、LT0を緩衝フッ化水素酸でエッチングして金属コンタクト・パッドとの接点を開口させる。さらなる処理工程を行って親水性酸化ケイ素の表面に疎水性領域をパターン形成する。

酸化ケイ素基板の疎水性パターン形成

クロム金属の $0.1 \text{ } \mu\text{m}$ 層を処理済の水（processed water）上に電子ビーム蒸着する。フォトレジストPR1827を塗布し、2000 rpmで30秒間回転する。このレジストにパターンを形成し（SAM マスク）、現像する。露出したクロム金属をクロム腐蝕液でエッチングして酸化ケイ素を露出させた後、フォトレジストを剥離させ

る（工程5）。次に、これらのサンプルをアセトン、イソプロピルアルコール及びDI水で各々10分間清浄化して風乾し、100℃で5分間オープン乾燥する。その後、サンプルをトルエン中1%のオクタデシルトリクロロシラン（OTS）の溶液に15～30分間入れる。OTSがサンプル上に自己構築単層（Self Assembled Monolayer）（SAM）として堆積する（工程6）。次いで、これらのサンプルをトルエン、イソプロピルアルコール及びDI水で各々5分間すすいだ後、オープン乾燥する（100℃、5分間）。次に、それらをクロム腐蝕液に入れて下のクロム層を除去する。この結果、クロム金属上のSAMがリフト・オフする。その後、サンプルをDI水ですすいで風乾することで無処置の疎水性領域が親水性酸化物基板上に生じる（工程7）。ヒーター素子及びRTDも石英基板上に製造されている。この製造工程はシリコン処理工程のものに類似する。

ガラス・チャンネル及びチャンバの製造

チャンネル及びチャンバの製造（図8C）は、500 μm 厚のガラス水（glass water）（Dow Corning 7740）上に金の0.4 μm 金属層を堆積（電子ビーム蒸着）させることによって開始する（工程1）。クロムの0.06 μm 層を接着層として用いる。フォトレジストを塗布し、ガラスマスク1を用いてパターンを形成して現像する（工程2）。金属層を金腐蝕液（Gold Etchant TFA, Transene Co.）及びクロム腐蝕液（CR-14, Cyantec Inc.）でエッチングする。次に、到達可能なガラスを新たに調製したフッ化水素酸及び硝酸の溶液（7：3、v/v）でエッチングする。エッチング速度は約5 μm /分であり、エッチング深さは粗面計を用いて測定することが好都合である。金属層を除去し（工程3）、ウェハをDI水ですすいで風乾し、100℃で20分間オープン乾燥する。ガラス表面に疎水性領域をパターン形成するため、以下の処理工程を行う。

ガラス基板の疎水性パターン形成

1.5 μm 厚のアルミニウム層を電子ビーム蒸着し、エッチングしたチャンネル及びチャンバを覆う（工程4）。濃厚フォトレジスト（AZ 4620）を塗布し、750 rpmで50秒間回転させる（工程5）。このレジストにパターンを形成し（SAM マスク）、現像する。露出したアルミニウムをアルミニウム腐蝕液でエッチングする。フォトレジストを熱PRS 2000（J.T. Baker）で剥離する（工程6）。その後、こ

これらのサンプルをアセトン、イソプロピルアルコール及びDI水で各々5分間清浄化し、100℃のオープン内に10-15分で水を飛ばして乾燥する。次に、これらのサンプルをトルエン中に1%のOTS溶液に10-15分間浸漬する（工程7）。SAMの堆積をドラフト内で行った。続いて、サンプルをトルエン、イソプロピルアルコール及びDI水で各々5分間すすいだ。次に、それらを、全ての金属アルミニウムが除去されるまでアルミニウム腐蝕液に入れた（工程8）。その後、サンプルをDI水ですすいで風乾した。頂部からの導入口を備える装置については、電気化学的放電穿孔によってホールを穿孔した。

【0096】

続いて、ガラス側をシリコン側の頂部とそろえて並べた後、光学接着剤（SK-9 Lens Bond、Sumers Laboratories、Fort Washington、PA）を用いて互いに接合した。この接合を紫外線源（365 nm）の下で24時間硬化させた。

【0097】

IV. 構成要素のデザイン

本発明は、マイクロ規模装置の構成要素としての1つ以上のゲル電気泳動モジュールを意図している。理論的及び経験的研究により、電気泳動チャンネルの厚みを減少させることが解像度の改善につながることを示されている。より薄いゲルは熱をより容易に分散させ、かつより高い電圧を用いることを可能にし、これに伴って分離が改善される。電気泳動検出器の位置及び幅もその電気泳動システムの最終的な解像度にとって重要である。下層をなすシリコン基板に配置されたマイクロ加工された電子検出器、例えばフォトダイオード、はゲルマトリックスから1ミクロン以下に存在することができ、5ミクロン未満の幅を有し得る。2つの移動するバンドの分離に必要とされるゲル長は検出器の解像度に比例するため、ミクロン幅の電子検出器を組み込むことにより、標準的な遺伝子型決定に必要とされる全ゲル長を少なくとも10倍までの倍率で減少させることができる。

【0098】

ミクロン径のチャンネルで標準的なゲル電気泳動が作動可能であることを示すため、図6Bと同一のエッチングされたガラスチャンネル及び蛍光標識DNA（YOYO挿入染料）を用いてモジュールを組み立てた。幅500 μm 及び深さ20 μm のチャン

ネルにおける複合DNA混合物のポリアクリルアミドゲル電気泳動が図6Aに示されている。この電気泳動は正電極を右に配置し、DNA試料を左に塗布して行った。白色の垂直線はゲル・バッファ界面である。DNA試料 (MspIで消化したBluescriptKS) を挿入UV蛍光染料 (YOYO-1) で標識し、白熱光の下で可視化した。成分バンドの分離が、バッファ・リザーバーゲル界面から300 μ m未満で明瞭に可視化される。検出器 (この場合には、顕微鏡) の高い解像力により、著しく短いゲルを使用して幾つかの接近して溶離するバンドを分離することが可能となった。

【0099】

本発明は、マイクロ加工チャンネル及び電子DNA検出器を一体化する電気泳動ユニットを意図している。このチャンネルは、前に記述される接合表面エッチング法ではなく、犠牲エッチングプロセス (sacrificial etch process) を用いて一枚のシリコンウェハ上に構築される。この犠牲エッチング技術においては、所望のチャンネル高と等しい厚みを有するエッチング感受性材料 (ホスホシリケートガラス、 $\text{SiO}_2 \cdot \text{P}_x$) をウェハ表面に堆積させることによりチャンネル形状をパターン形成する。犠牲材料を、頂部又は側部の小アクセスホールを除いて、プラズマ増強化学蒸着窒化ケイ素、非ドーパ多結晶シリコン、及び窒化ケイ素の三層オーバーレイ (Si_3N_4 / ポリSi / Si_3N_4) で完全に覆う。選択的液体エッチングにより犠牲層材料は除去されるが、オーバーレイ又は下層をなす基板は除去されない。この犠牲エッチング技術の結果、チャンネルが電子構成要素を有する基板上に直接形成される (図4C及び4D)。その深さ3 μ mのチャンネルは、いずれかの端部に、構成要素をなすリンドーパ多結晶シリコン電極と共に2つのバッファ・リザーバを有する。この技術によって形成されるチャンネルの高さ ($\sim 3 \mu$ m) は、犠牲層堆積の限界及び被覆層の強度から、接合構造の高さよりもかなり小さい。これらのチャンネルの寸法に対して、液滴はピコリットルのオーダーの体積を有することに注意されたい。

【0100】

図9Bは、シリコンウェハ上に加工された4つ一組のドーパ拡散ダイオード照射検出器素子の顕微鏡写真である。各々の素子について、3つの平行する暗線は、ガードリング (guard ring) 遮蔽電極が隣接する検出器中央の拡散領域を定義す

る。これらの拡散領域は長さが約300 μm 、幅が4 μm である。

【0101】

外縁を取り巻く5 μm 幅のガードリングを有する10 μm 幅の“p-n”型ダイオードからなる照射検出器は、チャンネル下のシリコン基板内に直接加工されている。この実施においては、(i) 高感度 (1回の減衰現象)、(ii) 小さい開口寸法、及び (iii) 公知の加工及び応答特性のため、構成要素をなす照射検出器を選択した。この電気泳動システムでは、長さ1 cm、厚み3 μm のゲルでDNAの80及び300塩基対断片の分離を行うことができる。このダイオードは、現在では高エネルギー β 粒子検出用に作製されているものの、光子検出器としても作動し得ることに注意すべきである。適正なフィルタ及び光源を用いることで、同じ装置で蛍光発光の検出に対応することができる。

【0102】

放射検出器は以下のように作製した。200.5 cm、〈100〉、フロートゾーン (float zone)、ホウ素ドーパ型シリコンウェハを基板として用いた。リン ($5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$) 及びホウ素 ($1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$) の拡散層をサンプルのリソグラフィで定義した領域にイオン注入し；サーマル酸化ケイ素をウェハ全面にわたって成長させ (900°Cで0.2 μm) ；及び緩衝フッ化水素酸溶液 (5:1) を用いて拡散層にコンタクトホールをエッチングした。3.3 μm のMicroposit 1400-37の層にパターンを形成して金属パッドを定義し；50nmのクロム、次いで400nmの金をレジスト全体にわたって蒸着させ；その金属被覆でレジストを保持する領域をリフト・オフする。Microposit 1813フォトレジストの層をウェハ全体に塗布し、110°Cで30分間バークして水溶液障壁を形成した。フォトレジスト層上に配置したPCR反応バッファ中の標識DNAのサンプルを用いて、放射性リン (^{32}P) の減衰現象を検出することができた。この検出器を電荷感受性プリアンプ (EV-Products 550A)、次いでリニア・シェイピング (linear shaping) アンプ及び標準オシロスコープに接続した。

【0103】

図9Cは、 ^{32}P 標識DNAの個々の減衰現象を示す、放射検出器からの出力のオシロスコープ・トレースを示す。水性DNAサンプルを検出器上に直接配置し、30秒間

サンプリングした。このスクリーンは0.5V/区画の垂直スケール及び20 μ 秒/区画の水平スケールを表示している。

【0104】

【実験】

以下の例は本発明の特定の好ましい態様及び側面を説明する役目を果たすものであり、それらの範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【0105】

以下の実験の開示においては、以下の略語を適用する：eq（当量）；M（モル濃度）； μ M（マイクロモル濃度）；N（正常）；mol（モル）；mmol（ミリモル）； μ mol（マイクロモル）；nmol（ナノモル）；gm（グラム）；mg（ミリグラム）； μ g（マイクログラム）；L（リットル）；ml（ミリリットル）； μ l（マイクロリットル）；cm（センチメートル）；mm（ミリメートル）； μ m（マイクロメートル）；nm（ナノメートル）； $^{\circ}$ C（摂氏）；Ci（キュリー）；MW（分子量）；OD（光学密度）；EDTA（エチレンジアミン四酢酸）；PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）；UV（紫外線）；V（ボルト）；W（ワット）；mA（ミリアンペア）；bp（塩基対）；CPM（カウント毎分）。

実施例1

この例は、マイクロ規模装置の電気素子全体にわたって水分障壁を形成する問題に対するアプローチを説明する。初期プロトタイプでは5000オングストロームのアルミニウムを用い、それをPECVD SiO_x で被覆した。試験により、液体がこの層を透過し、アルミニウム加熱素子を破壊したことが決定された。

【0106】

何がこの問題を引き起こしたのかの明瞭な証拠はないが、アルミニウムのステップ高が受動層（酸化物）にクラックを生じさせたと仮定した。このクラック生成の問題を軽減するため、追加の厚みがステップ高によって生じるクラックの生成を克服するという考えで、 Si_3N_4 の層を SiO_x の2つの層の間で試した。

【0107】

追従アプローチとして、アルミニウムの薄層（500オングストローム）を試した。これにより元のプロトタイプ装置のステップ高の1/10がもたらされた。こ

のアルミニウムの頂部に、 SiO_x 、 Si_3N_4 、及び SiO_2 の三層を施した。さらに、 Si_3N_4 層を作製するためのプロセスをより厚い層をもたらすものに変更した。これにより問題が解決するように思われた。しかしながら、アルミニウムの薄層は、許容することができない大きい抵抗を創出した。比較的滑らかな（平坦な）表面を保持しながら、抵抗をより小さくするためにアルミニウムのより薄い層を生成する方法が必要であることが決定された。この課題を達成するため、エッチ・バック（etch back）プロセスを用いた（ここでは“嵌合プロセス”と呼ぶ）。生じた穴において SiO_2 堆積アルミニウムの層にエッチ・バックした後、レジストマスクを剥離することにより、受動層のクラック生成を防止するのに十分な低さを有するステップ高を備える表面が得られた。

【0108】

金属接合パッドが初期PECVD SiO_2 層に十分に接着していないことも発見された。この問題を克服するため、湿潤サーマル SiO_2 層を用いることによりプロセスを修正した。

実施例2

この例は、表面処理により液滴の運動を増強しようとするアプローチを説明する。これに関して、液滴を移動させるのに表面張力を用いる原理を親水性又は疎水性表面のいずれに対しても適用することができる。例えば、ガラスは本来親水性であり、水との接触角はほぼゼロである。本発明の酸化物コーティングは主としてガラスと同じ材料から作製されるため、それらの装置もほぼゼロの角度を示すことが予想された。しかしながら、実際の構成物質はゼロとはかけ離れた接触角を有しており、したがって接触角ヒステリシスの効果を増強することが発見された（実施例3においてより詳細に論じられている）。例えば、水はポリアミド上で $\sim 42^\circ$ 、 SiO_2 （大部分のガラスの主要成分）上で $\sim 41^\circ$ 、シリコン・スプレー上で $\sim 62^\circ$ の接触角（静止）を示す。表面の有効性を高めるため、以下に示されるように、親水性及び疎水性表面の両者に向けた幾つかの処理プロセスを試みた。

【0109】

表面の親水性を改善するため、幾つかの洗浄手順を試みた。表面の汚染及び／

又は粗さが表面の親水性を低下させ得ることが報告されている。したがって、高濃度のクロム酸洗浄、高濃度の硫酸洗浄、ベーキング手順（汚染物質を焼き払うため600℃まで8時間）、及び表面コーティングを試みた。酸洗浄手順はベーキング手順ほどには有効ではなかった；しかしながら、濃酸はアルミニウムパッドを攻撃し、高温はアルミニウム（融点～660℃）を剥離させ、又はヒーターチップとチャンネルとの間の接着接合を破壊する可能性があるため、いずれも適合し得るものとは立証されなかった。

【0110】

処理としてのRain-X曇り止め剤（市販品）が機能することが観察された。これは表面を親水性にする表面処理である。生じる表面は0°ではないかもしれないが、このコーティングを用いることにより表面全体が処理されて液滴に均一な表面を提供する。実験的に、Rain-X曇り止め剤処理が熱を用いる液滴移動実験を著しく増強することが見出された。試験したものの機能しなかった別のそのような処理はSilWetと呼ばれる材料であった。この材料は農芸産業において農産物用スプレーでの植物の湿潤を高めるために用いられる。

【0111】

疎水性表面を得るため、本発明者らはRain-X及びシラン処理でのキャピラリの被覆を試みた。これらのいずれも90°より十分に大きい角度をもたらず、したがって、この機構では機能しなかった。これらの処理は、移動の疎水性研究に有用であるためには、～180°の所定の角度を有していなければならない。最終的に、テフロンコーティングを適用できることが発見され、これは将来的な試験をおそらくは保証するのに十分な疎水性であった。

実施例3

この例は、熱処理による液滴移動に対するアプローチを説明する。前に（上に）記述されるように、移動中の液滴の（前進接触角として知られる）前進端での接触角は後退端でのもの（後退接触角）よりも大きい。親水性表面の場合一例えば、ガラス上の水一、これは液滴の後側を加熱することによる前進運動の試みに対抗する背圧を生じる傾向にある。これは、チャンネルを通る層流を説明する単純なモデルによって最良に示される。

【0112】

循環チャンネルを通る平均流：

$$\langle v \rangle = -\Delta P \cdot [R^2 / (8\mu L)]$$

ここで： Δ ＝液滴の後端での値－前端での値

$\Delta P = (1/R) \cdot (\Delta G)$ ＝液滴端部間の圧力の差

ΔG ＝液滴の端部間の表面張力の変化

R ＝チャンネル半径

L ＝液滴長

μ ＝粘度

また、水については $\Delta G = -\text{constant} \cdot \Delta T$ であり、ここで温度の上昇はほとんどの液体の表面張力を低下させる（水については $\text{constant} = 0.16 \text{ dyn/cm}$ ）。

【0113】

したがって、

$$\langle v \rangle = -(\Delta G) \cdot (1/R) \cdot [R^2 / (8\mu L)] = [-0.16 \cdot \Delta T \cdot R / (8\mu L)]$$

ここで： $\Delta T = T_{\text{back}} - T_{\text{front}}$ であり、

$$\langle v \rangle = [0.16 \cdot R / (8\mu L)] \cdot (T_{\text{back}} - T_{\text{front}}) \text{ が得られる。}$$

この表現は、液滴の後端に対するあらゆる加熱が（前部が低温のままである場合）液滴を移動させることを示す。しかしながら、これは実験的には当てはまらなかった。ガラスキャピラリーを用いる研究により、液滴を移動させるのに必要な最小温度差が存在することが見出された。この効果は接触角ヒステリシス（CAH）の結果であるものと信じられる。CAHにおいては、前進接触角は後退接触角よりも大きく、これが一種の背圧を生じ、これは液滴の運動を達成するのに克服しなければならない。CAHは界面が移動する場合に生じる（動的角度）。この効果を説明するため、それを流動の定常状態（ID）モデルに組み込んだ。例えば、（液滴の前部が25℃で）前進角が36°及び後退角が29°である場合、20μm高のチャンネルにおいて、1mm長の液滴については液滴の背部を～60℃に加熱する必要がある。これはまさに1つの例の状況である。

【0114】

しかしながら、チャンネルの寸法及び流体パラメータ（表面張力以外）はその

液滴が移動するかどうかに影響を及ぼさないことが実験的に発見された。それらは（それが生じる場合）移動の規模を決定する。移動が生じるかどうかを決定するものは以下の不等性である：

$$G_{\text{front}}/G_{\text{back}} > (R_{\text{front}}/R_{\text{back}}) \cdot (\cos \beta_{\text{back}}/\cos \beta_{\text{front}})$$

ここで： β = 接触角である。

【0115】

この計算は、液滴の前部と背部との $\sim 35^{\circ}\text{C}$ の差が、 $20\mu\text{m}$ 高のチャンネル内で 36° の前進角及び 29° の後退角を有するシステムにおいて液滴の運動を開始させるのに十分なものであることを示唆する。しかしながら、実際の装置の実験的試験では、液滴の前部が比較的迅速に加熱され、したがって移動に必要な液滴の前部と背部との温度差が減少することが示された。この効果のため、液滴の運動を得るのにより高い電圧を用いることが必要であった。典型的には $\sim 30^{\circ}$ ボルトの範囲の電圧が運動を得るのに必要であることが見出された。さらなる実験により液滴の前部と背部とで生じる温度差が $\sim 40^{\circ}\text{C}$ であることが示され、したがって、必要条件の最初の決定が確認された。

【0116】

熱勾配を用いる、マイクロ加工チャンネル構造における個々の液滴の運動が図4のビデオ記録像に示されている。この装置は平坦二酸化ケイ素基板に嵌合された一連のアルミニウムヒーター（図2に示される構造に類似）からなり、接着剤により湿潤エッチング・ガラスチャンネル（深さ $20\mu\text{m}$ 、幅 $500\mu\text{m}$ ）に接合されている。液体サンプルはマイクロピペットを用いて左側の2つのチャンネルに手で添加した。各液滴の左界面を加熱することで、それがチャンネルの交点に向かって前進する。その交点で液滴が出会って合体し、単一のより大きい液滴を形成する。チャンネルの断面は $20\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ であるため、これらの液滴の各々の体積はそれらの長さから算出することができ、約50ナノリットルであることに注意されたい。

【0117】

図4に示されるチャンネルの全表面に沿うヒーターは、液滴運動装置に加えて、それを熱反応チャンバとして用いることを可能にする。図の上方の液滴はDNA

サンプルを含み、これに対して下方のものは制限消化酵素 (TaqI) 及び消化バッファを含む。サンプルが合体した後、構成要素をなすヒーター及び温度センサーを用いて合体した液滴を65℃で30分間維持した。チャンネルの右端から液滴を放出し、それをレーザ誘発蛍光検出器を備えるキャピラリゲル電気泳動システムに添加することによって酵素反応の完了を確認した。このシリコン装置サンプルによって作成されたクロマトグラムは、標準的なポリプロピレン微量反応容器 (図示せず) におけるDNA消化物の処理から生じたクロマトグラムに類似していた。

実施例4

この例は、本発明の装置の加熱及び温度感知のための回路を有する基板にチャンネルを接合するための様々なアプローチを説明する (上記二部構成の考察を参照)。第1の試みはポリアミドに関するものであった; 通常のポリアミドは、2つの断片が互いに固着しないことが見出されており、不満足なものであった。

【0118】

追従する試みは光定義可能なポリアミドに関するものであった。これは粘着性の表面を生じたが、チャンネルに沿う完全な封着をもたらすことがなかった。最終ベーキングプロセスの間に放出される溶媒がポリアミド層にポケットを生成していたことが発見された。‘硬化’により封着し、溶媒を放出しない接着剤層が必要であった。

【0119】

以下に列举されるように、幾つかの異なるエポキシ及び接着剤を調べた。

【0120】

【表1】

接着剤	形態	乾燥物	テクスチャ	注釈
1. Dymax UV Glue	ゲル	透明	ゴム様	UV露光で硬化
2. Carter's Rubber Cement	粘着物	黄色 / 透明	ゴム様	薄めたときに迅速に乾燥し、糸を引く
3. Borden's Krazy Glue	液体	透明	硬質	希薄で、最初の接触時に乾燥
4. UHU Bond-All	ゲル / 粘着物	透明	硬質	薄めたときに迅速に乾燥し、糸を引く
5. Dennison Permanent Glue Stick	ペースト	透明	硬質	塗布時に流動しない
6. Elmer's Glue-All (Borden)	濃厚液体	白色	硬質	徐々に乾燥
7. Liquid Nails	希薄ペースト	木様	硬質	濃厚で、薄めたときに迅速に乾燥
8. Devcon 5-Minute Epoxy	ゲル	黄色 / 透明	硬質	濃厚で、約5分で硬化
9. Scotch Double-Stick Tape	テープ	透明	ゴム様	テープ
10. Dow Corning High Vacuum Grease	濃厚ゲル	霜様	軟質	封着するが接合しない
11. Nujol Mineral Oil (Perkin Elmer)	液体	透明	流動性	封着も（ガラス上に広がらない）接合もしない
12. Household Goop	ゲル / 粘着物	透明	ゴム様	乾燥して糸を引く接触セメント
13. Permatex Weather Strip Cement	ゲル / 粘着物	黄色 / 透明	ゴム様	薄めたときに迅速に乾燥し、粘着性
14. Thick Gel Super Glue	ゲル	透明	硬質	接触時には硬化しないが、迅速に硬化する
15. DAP Weldwood Contact Cement	粘着物	オレンジ色 / 透明	ゴム様	薄めたときに粘着性になる接触セメント
16. Scotch (3M) Photo Mount Spray Adhesive	希薄粘着物	黄色 / 透明	ゴム様	スプレー。'粘着性'ではあるが糸は引かない
17. Silicone Resin (spray) Lacquer (GC Electronics)	液体	透明	滑らか	スプレー。乾燥して薄く、透明で封着したコーティングとなる

【0121】

UV接着剤の塗布プロセスは冗長なものであり、かつふさわしくない場所、例えばチャンネル内、に接着剤を付けるのを回避する技を必要とするが、好ましい接

着剤はUV硬化接着剤であった。

【0122】

水酸化物接合及び接合する基板のスクリーン印刷も試みた。他の選択肢はガラステープであったが、そのテープを熔融するのに要する高温は本発明の装置には高すぎるように思われた。

実施例5

この例は、シリコンベースの基板上での核酸増幅反応を説明する。PCRについて確立されたDNA生化学工程は生理学的条件のイオン強度、温度、及びpH内で生じる。したがって、反応チャンバ構成要素には設計上の制限があり、溶液中のDNA、酵素及び他の試薬に適合するものでなければならない。

【0123】

生体適合性を評価するため、構成要素を標準PCR反応に添加した。それらの結果（図10を参照）は、結晶シリコンが生物学的適合性にとって理想的な材料ではない可能性があることを示した。これらの結果を考慮すると、マイクロ加工シリコン基板の表面を吸着表面作用物質、共有結合ポリマー、又は堆積酸化シリコン層で修飾することが望ましいものであり得る。

【0124】

生物学的に適合する加熱素子を形成するため、本発明者らは、標準シリコンウェハを $0.5\mu\text{m}$ の二酸化ケイ素層で被覆することにより開始した。次に、深さ $0.3\mu\text{m}$ 、幅 $500\mu\text{m}$ のチャンネルを酸化ケイ素にエッチングし、金又はアルミニウムを堆積させた（ $0.3\mu\text{m}$ 厚）。この嵌合プロセスにより比較的平坦な表面が生じ、水不透性層を堆積させるための基体がもたらされた。不透性層は一続きの3回のプラズマ増強蒸着によって作製した：酸化ケイ素（ SiO_2 ）、窒化ケイ素（ Si_3N_4 ）、及び酸化ケイ素（ SiO_2 ）。これらの材料は気相から堆積させるため、正確な化学量論は不明である。狭い金属インレーにより下層をなす透明基板、例えば、ガラス又は石英を通して液体サンプルを見ることが可能になるため、この装置には、マイクロ加工PCR反応チャンバについて前に示されたドーピングシリコン抵抗ヒーターではなく薄い金属ヒーターの設計を用いた。また、幾つかの独立した加熱素子を用いることで、大部分の素子をヒーターとして機能させながら、少数を非常

に正確な抵抗温度センサーとして作動させることが可能となる。

【0125】

金属抵抗ヒーター及び酸化物／窒化物／酸化物コーティングで組み立てた装置を既知DNAテンプレートサンプルのPCR増幅を用いることにより生物学的適合性及び温度制御について試験した。この反応は、平面装置上で、蒸発を防止するために鉱油で覆った20マイクロリットルのPCR反応混合物を用いて行った。この反応混合物を、標準的な35サイクルのPCR温度循環方式により、プログラム可能なコントローラに連結した構成要素をなす温度センサーを用いて循環させた。反応体積が元のヒーターの設計について意図されたものよりもかなり大きかったため、ポリプロピレン環をヒーター表面に接合してサンプル封入チャンバとして機能させた。全ての試験事例において、増幅された反応生成物の存在が二酸化ケイ素の表面及びヒーターの設計が反応を阻害しなかったことを示した。市販のPCRサーモサイクラで平行して行った増幅実験は同様の結果をもたらした。一連のPCR適合性試験により、この装置上での反応がコントローラの設定及びサンプルと接触している最終表面材料に対して非常に感受性であることが示された（図示せず）。

【0126】

上述のことから、本発明が遺伝子型決定のような大容積プロジェクトに適合し得ることが明らかなはずである。マイクロ液滴輸送により液体の取り扱い及び試薬の混合における現在の非効率性が回避される。さらに、これらの装置は、生物学的反応を含む反応の性質によって制限されることがない。

実施例6

この例においては、試験構造体を組み立てる（図11）。この試験構造体は非常に単純である（図11）。主要部分はSi基板の頂部上の5層の材料を用いる2マスクプロセスで構築される。最下層から最上層に向かって、SiO₂はSi基板とはんだパッド及び加熱素子として機能する他の金属層との絶縁体としての役目を果たす。Ti層（250Å）はNiの接着のためのものである。Ni（1000Å）及びAu（1000Å）の層ははんだの拡散障壁として作用する。Au層は湿潤可能なパッドとしての役目も果たす。最後に、はんだ層は2つの基板を互いに接合するためのものである。はん

だは金属層を加熱することにより熔融する。接合される他の基板ははんだを除いて同じ構成を有する。

【0127】

この試験構造体においてはサーモ・ニューマチック (thermo-pneumatic) ミクロ弁を用いる。ミクロ弁の模式図及びプロセスの流れが図12に示されている。波形ダイヤフラムをその大きな偏向及び高い感受性から選択する。ダイヤフラム (側部長=1000 μm 、厚み=3 μm 、ボス・サイズ長=500 μm 、ボスの厚み=10 μm) は1気圧の印加圧力で27 μm の偏向を有する。この印加圧力は、より大きな作動力をもたらすサーモ・ニューマチック機構によって生成される。1気圧の圧力はダイヤフラムとガラスとの間の空洞においてフレオン-11により、それが室温より11°C高く加熱されたときに生じる。図9に示されるように、ミクロ弁を加工するのに10のマスクが予想される。

【0128】

図9aはシリコン基板10の一部を示すものであり、これは通常の厚み及び中程度ドーピングのp型 (100) 指向性Siウェハである (>1 cm)。しかしながら、好ましいウェハの厚みは通常ウェハ径の関数である。基板10を含むシリコンウェハの上面12を通常の許容される様式で包み、研磨して清浄化する。リアクティブ・イオン・エッチング (RIE) を用いる等方性エッチングにより、フォトレジストをマスキング材料として用いてダイヤフラムの畝が形成される。

【0129】

図12Bは、完成装置の縁、中心ボス、導入及び排出ホールを形成するための深部ホウ素拡散領域16の定義を示す。図12Cは、ダイヤフラムを形成するための浅部ホウ素拡散領域18の体積を示す。次に、はんだ20を含む様々な金属層を堆積させる。深部及び浅部ホウ素拡散プロセスにより、ダイヤフラムの形状及び溶解ウェハプロセス (dissolved wafer process) のためのエッチング停止 (etch-stop) が定義される。

【0130】

これに続いて、図12Dは、完成装置のはんだの絶縁体としての役目を果たす酸化物層22の定義を示す。その後、図12Eに示されるように、Ti接着/Ni/Au障壁

及び湿潤可能なパッド24を堆積させる。次に、Ni及びフォトレジストのはんだ型26を図12Fに示されるように定義し、第1のNiチャンネル28を、フォトレジストを犠牲層として用いる表面マイクロ加工により作製する。EDPを用いてNiチャンネルホールを定義して犠牲層を除去し、チャンネルホール30を定義する（図12G）。

【0131】

第2のNiチャンネル32を図12Hに示されるNi及びフォトレジストによって定義し、導入ホール34及び排出ホール36をEDPを用いて定義して犠牲層を除去する（図12I）。

【0132】

最後に、ガラス38内のTi/Ptヒーターをシリコン基板に陽極的に接続する（図12J）。フレオン-11をガラス基板のホール（図示せず）を通して空洞に充填する。このホールはダイヤモンド・ドリルビットで作製し、エポキシで封着する。

実施例7

この例においては、試験構造体において低融点はんだを用いることを目的とした。普遍的に有用なはんだ封着マイクロ弁が気相微量分析システムにおいて用いられるため、気体の特性に影響を及ぼし得る高融点（m. p.）はんだ（ $>200^{\circ}\text{C}$ ）を用いることは望ましいものではない。加えて、高m. p. はんだは集積回路のような装置上の他の構成要素に影響を及ぼし、電力消費を増加させることがある。結果として、低融点はんだが必要である。ビスマス含有はんだは $47-138^{\circ}\text{C}$ の最低m. p. を有する。しかしながら、試験構造体をこの群に属するはんだのプールに浸漬したとき、全ての金属層がはんだ溶液に溶解した。さらに、このはんだは、試験構造体の表面の湿潤において選択的ではなかった。

実施例8

実施例7に記載される実験の結果に照らし、市販の60:40 Sn:Pbはんだ（m. p. 183°C ）を用いて試行した。試験構造体をこのはんだの溶液に浸漬したとき、金属層は無傷のままであった。さらに、これらの層はこのはんだに対して優れた湿潤性を示し、すなわち、このはんだは金属領域のみに限定された。

実施例9

この例においては、チャンネル内の流体流動を遮断するための装置及び方法を

説明する。図10はこれらの態様の試験模式図を示す。加熱素子42と協働する60 : 40 Sn : Pbはんだ40を側部チャンネル44内に配置する。加熱素子42がはんだ40を少なくとも部分的に液化し、気流46が液化したはんだを側部チャンネルから主チャンネル48に移動させて冷却し、主チャンネルを遮断する。

実施例10

この例においては、ガラス及びシリコン基板上に疎水性領域をパターン形成するのに上述のリフト・オフ法を用いて製造した装置を、水滴の分離について試験した。この装置に対して、パターン形成された金属薄膜を親水性基板上で疎水性にするように選択された領域を露出するために用いた。クロム、金又はアルミニウムを金属層として用いた；金属の選択は他の処理工程との処理の適合性及びエッチングしたチャンネルをカバーするステップ高範囲に基づく。

【0133】

10 μ mという狭いライン幅を本発明の方法を用いてシリコン基板にパターン形成した。図14は、この新規技術によってパターン形成された疎水性（A）及び親水性領域のラインによって分離された水滴を示す（中央の疎水性ラインの幅は1 mmである）。OST（SAM）被覆酸化ケイ素表面上での水の接触角は約110°と測定された。

【0134】

厚いレジストを用いるリソグラフィーを実施することにより、ガラスにエッチングされたチャンネル内に疎水性領域を規定することもできる。特には、OTS（SAM）溶液に浸漬する前の基板の清浄化が重要であることが見出された；不適切な清浄化は部分的に基板を被覆する膜を生じる。

実施例11

上記実施例10の結果は、疎水性及び親水性パターンが基板表面上での水性液体、より具体的にはそのような液体のマイクロ液滴の配置を規定及び制御することを可能ならしめることを示す。図15は、1つの液滴を複数の液滴に分割することへのこのパターン形成技術の単純な使用を示す。疎水性（黒）及び親水性（白）区画が交互に並ぶ同心性パターンを上述の本発明の方法を用いてシリコン基板に付与した（図15A；円の直径は1 cmである）。水滴をこのパターン上に置き（図15B

）、過剰の水をピペットを用いて吸引したところ、互いに分離した複数の液滴が生じた（図15C）。

実施例12

この例においては、側部導入口から数ミリメートル離してパターン形成された500 μm 幅の疎水性領域（すなわち小区画）を備える直線チャンネル（20–40 μm の範囲の深さ及び100–500 μm の幅）を用いて水をチャンネルの内部前面に配置する実験を説明する。連続ピペット（sequencing pipette）（Sigma、最小カウント0.5 μl ）を用いて水を導入口に置き、表面力（surface forces）によってチャンネル内に引き込む。制御された量の液体が導入口に置かれた場合には水の前面が疎水性小区画で停止する。しかしながら、チャンネルが溢れた場合には液体が疎水性小区画をオーバーランする傾向がある。この挙動は断面積がより小さいチャンネルにおいて顕著であった。

【0135】

小区画を越える液体のオーバーランを取り除くため、（図3に示されるもののような）疎水性小区画を越えて流れる水を停止させる設計を溢流チャンネルに導入した。これらのチャンネルの寸法は前と同様に深さ及び幅が変化する。導入口に置かれた水は内部に引き込まれ、交点で2つの流れに分割される。これらの2つの前面は、主チャンネル内の前面が疎水性小区画に到達するまではほぼ等しい速度で移動する。主チャンネル内の前面は疎水性小区画で停止した；しかしながら、他方の前面は移動し続けて過剰の注入水を引き込んだ。この溢流チャンネルの設計を用いることで、チャンネル寸法の変化の全範囲について水性液体をうまく停止させることができる。

実施例13

図16A–Eは、ヒーターを用いる本発明の装置（910）の一態様（作動中）の模式図及び写真である。図16Aは、導入口（920）に置かれた液体が疎水性界面で停止し、より具体的には、液体が接する疎水性領域（940）で停止することを示す。導入口（920）及び溢流（930）口を過剰の液体で遮断し、すなわち多量に充填し、生じた圧力が導入口から離れる方向にのみ作用することを保証した。ヒーター・レジスタ（991）を印加電圧によって作動させた。電流によって抵抗加熱が

生じ、続いてチャンバ（980）内の気温を上昇させ、従って圧力が増大した。圧力が特定の値まで増加した後に、マイクロ液滴が分割され、疎水性小区画を越えて移動する（図16B）。この液滴はヒーターを作動し続ける限り移動し続ける；液滴の速度はより遠方に移動するに従って減少する。これを生起する機構によって本発明を限定しようとするものではないが、追加の容積（液滴を移動させる容積）が圧力の減少を引き起こすものと信じられる。

【0136】

液滴の移動を停止又は遮断するために2つの方策を用いることができる。第1の方法においては、導入口及び溢流口を大気に開放し、ヒーターを徐々に停止させる。チャンバ内部の温度が室温程度まで急速に低下し、それによりチャンバ内部の圧力が減少する。導入口からの水がチャンバに流れ込み圧力を緩和する（図16C）。第2の方法においては、疎水性排出口をチャンバから離して右側に配置する。移動する液滴が疎水性排出口を通過すると直ちに（図16D）、液滴はさらなる移動を停止する（図16E）。この場合にチャンバを室温まで冷却することで、空気が排出口を通して流れて戻り、チャンバ内の低圧を緩和する。

【0137】

上記から、本発明の組成物、装置及び方法がエッチングされたチャンバ、チャンネル及びヒーターを用いるオン・チップ作動を可能にすることが明らかなはずである。機械的な可動パーツは必要なく、パターンは容易に製造される。上述の操作は単純な設計のためのものであるが、本発明では、複数のサンプルの導入及び複数のマイクロ液滴の移動（別々の液滴の同時移動を含む）を含むより複雑な装置が考慮されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明による一体化された分析システムの模式図。

【図2】

本発明によりシリコン装置を構成するための2部材でのアプローチを示す図。

【図3】

ナノリットル容積の液体サンプルを分割し、それを気体供給源からの気体を使

用して移動するための装置の1つの実施態様の模式図。

【図4】

内部気体圧力発生器を使用したマイクロ液滴を分割し、移動し、停止するための、本発明による装置の1つの実施態様の模式図。

【図5】

閉鎖されたチャンネル内での熱誘導液体マイクロ液滴移動の原理を示す模式図。

【図6】

2つのマイクロ液滴がYチャンネルの枝内を移動するときのビデオテープの選択されたコマを示す図であり、図6Aは2つのマイクロ液滴がYチャンネルの枝内のそれらのスタート位置にあるときを示し、図6Bは両方のマイクロ液滴の左界面を加熱することによる移動状態を示し、図6Cは交差時のマイクロ液滴を示し、図6Dはマイクロ液滴が合併して組み合わされたマイクロ液滴の形成を示す。図中の白抜きの矢じり印は各マイクロ液滴の後部凹凸面を示し、黒塗りの矢じり印は先頭凹凸面を示す。

【図7】

シリコンウエハーのはめ込みプロセス加熱素子及びチャンネルの顕微鏡写真であり、図7Aは、はめ込みプロセス加熱素子の表面を示し、図7Bは横断面を示す（矢印は、配置されたアルミニウム、酸化珪素、及び窒化珪素層を示す）。また、図7Cは、2つのチャンネルの交点に直に隣り合うウエハーのエッチングされた表面の断面図で示される、湿式エッチングプロセスを用いてガラス上に形成されたチャンネルの顕微鏡写真である。

【図8A】

シリコン基盤に結合されたガラス表面（top）を含む、本発明の装置の1つの実施態様の模式図。

【図8B】

シリコン中の構成成分の加工のための加工工程の1つの実施態様を示す模式図。

【図8C】

ガラス中の構成成分の加工のための加工工程の1つの実施態様を示す模式図。

【図 9】

図 9 A は、広くエッチングされたガラスチャンネル中のポリアクリルアミドゲル電気泳動の顕微鏡写真であり、図 9 B は、シリコンウエハー上に形成された 4 つのドープ拡散ダイオード放射線検出要素のセットの顕微鏡写真であり、図 9 C は、 ^{32}P 標識 DNA 由来の個々の崩壊イベントを示す放射線検出器からの出力のオシロスコープ記録である。

【図 10】

強力に阻害する構成成分が PCR に直接添加されたときの PCR 反応のゲル電気泳動の写真。

【図 11】

本発明の試験装置の 1 つの実施態様である。

【図 12】

本発明のシールし得る弁を加工するための 1 つの実施態様の図。

【図 13】

本発明の移動し得るシール手段のレイアウトのための 1 つの実施態様の図。

【図 14】

本発明の方法に従ってパターン化された疎水性領域及び親水性領域の線によって分離された水小滴を示す写真。

【図 15】

複数の小滴を創り出すための本発明の方法に従う簡単なパターン化を示す写真。

【図 16】

ヒーターを利用した本発明による装置の 1 つの実施態様の模式図及び写真。

【図1】

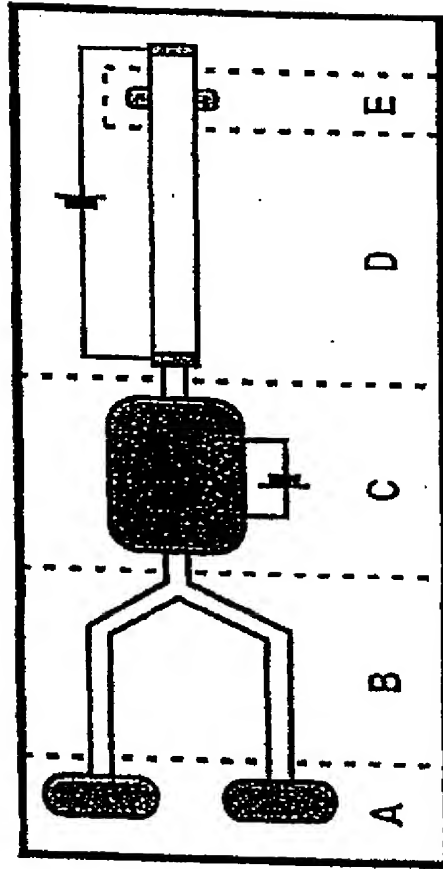


FIG. 1

【図2】

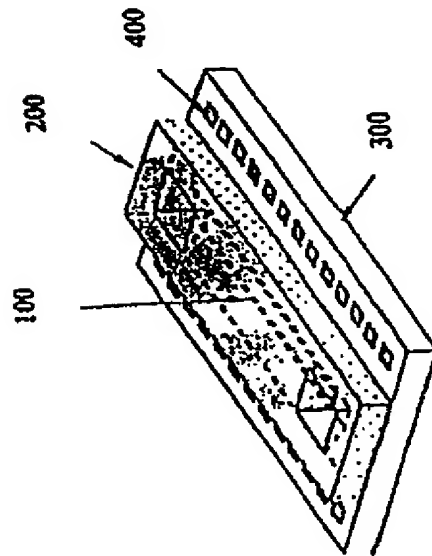


FIG. 2

【図3A】

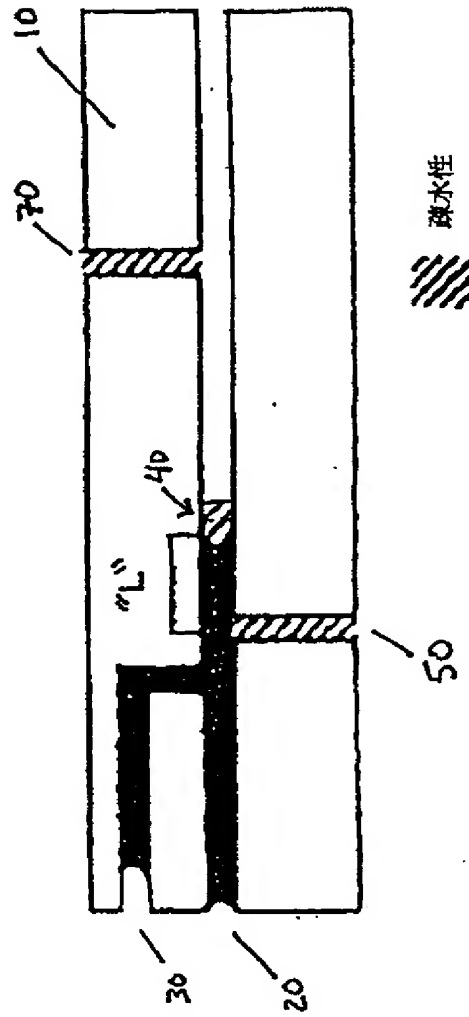


FIGURE 3A

【図 3 B】

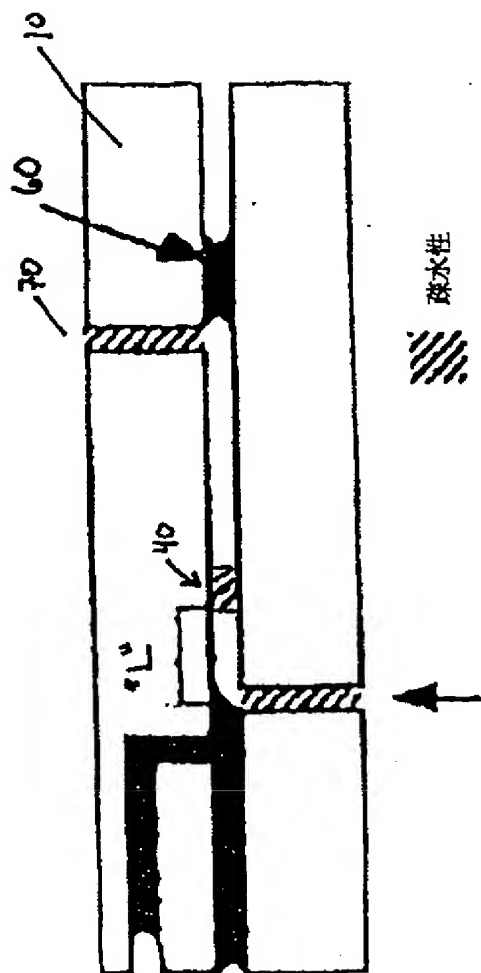


FIGURE 3B

【図4A】

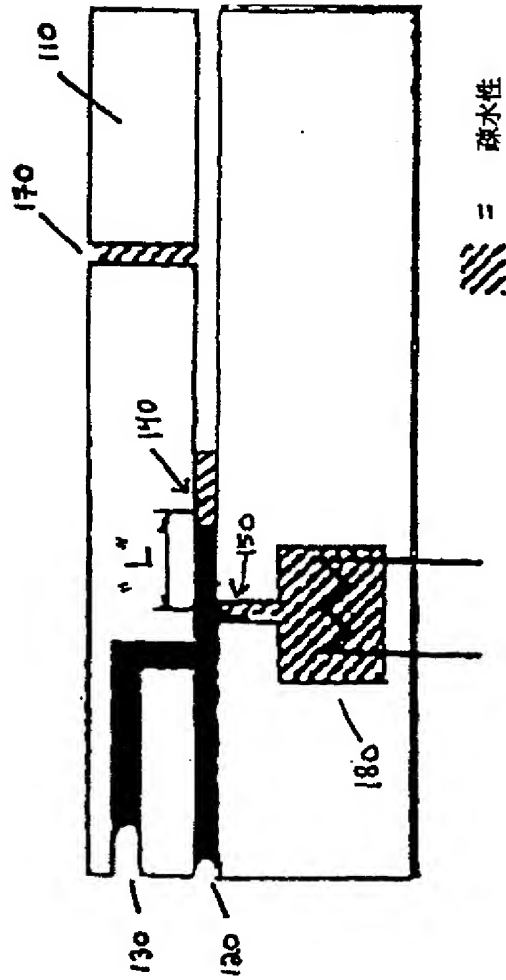


FIGURE 4A

【図 4 B】

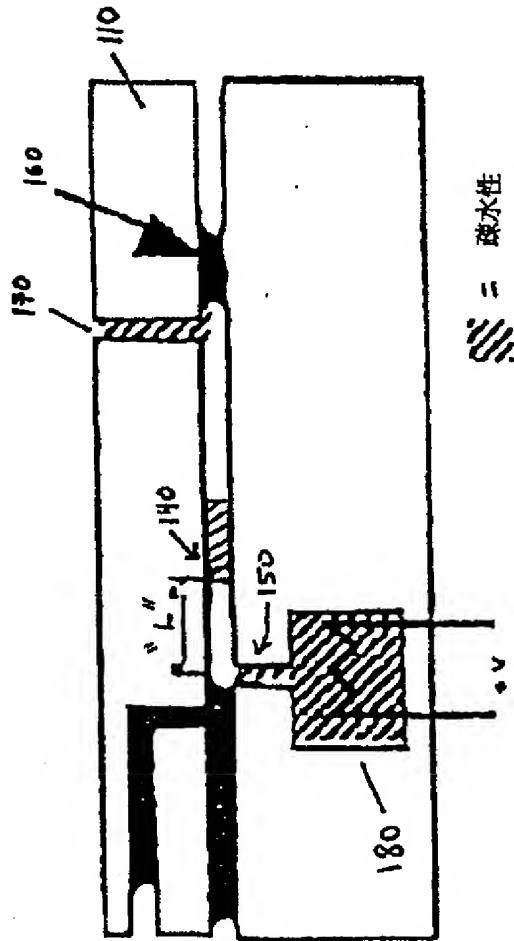


FIGURE 4B

【図 5】

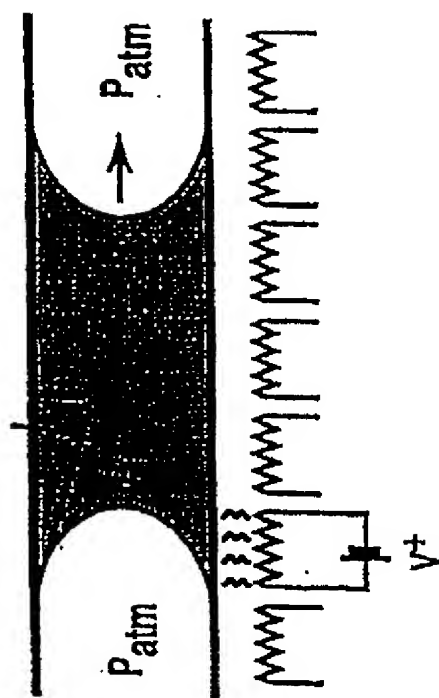


FIGURE 5

【図6】

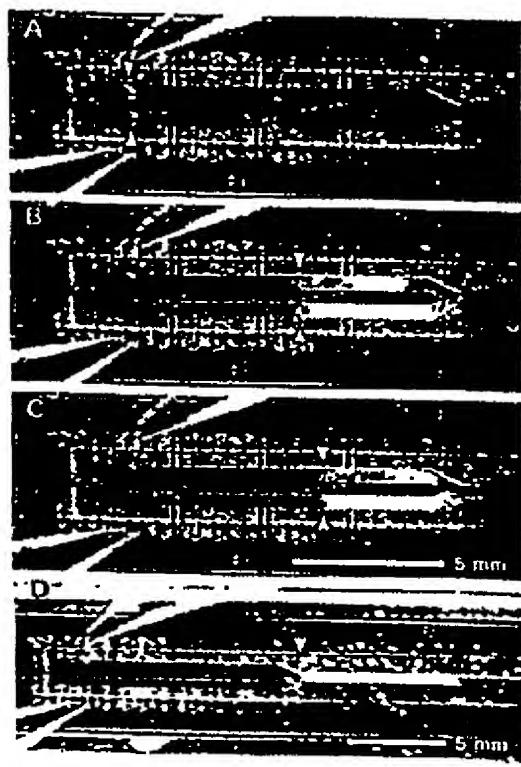


FIGURE 6

【図7】

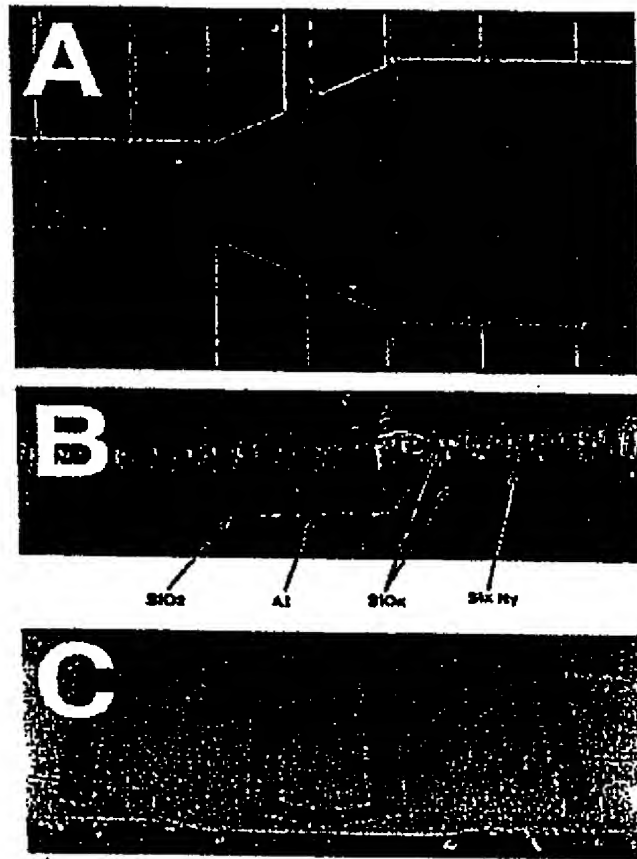


FIGURE 7

【図8A】

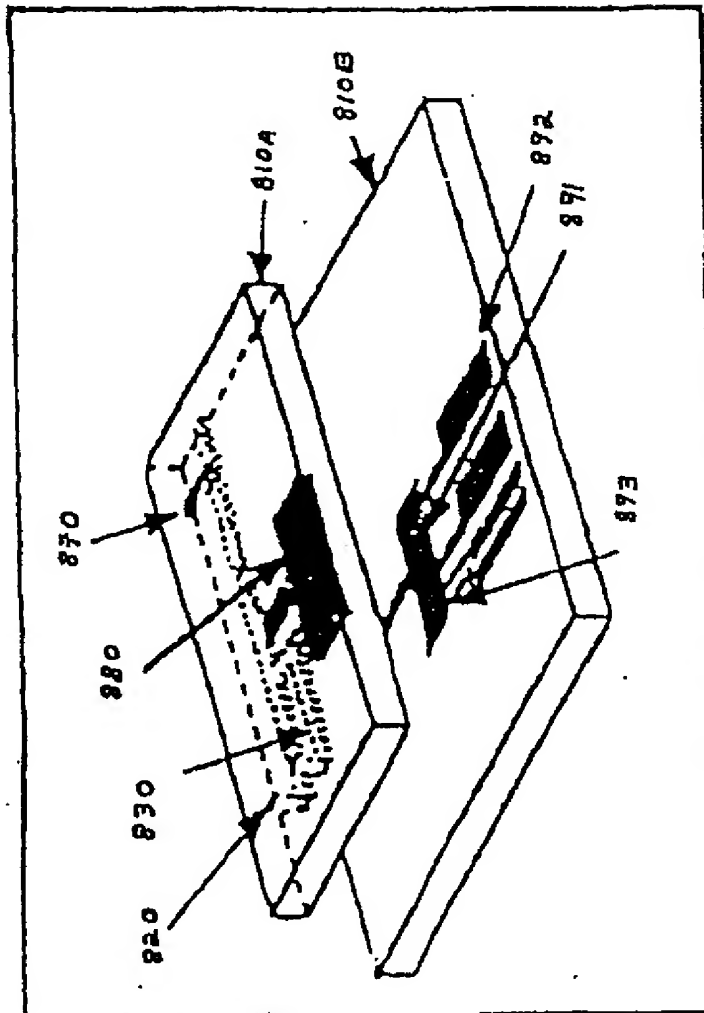


FIGURE 8A

【図8B】

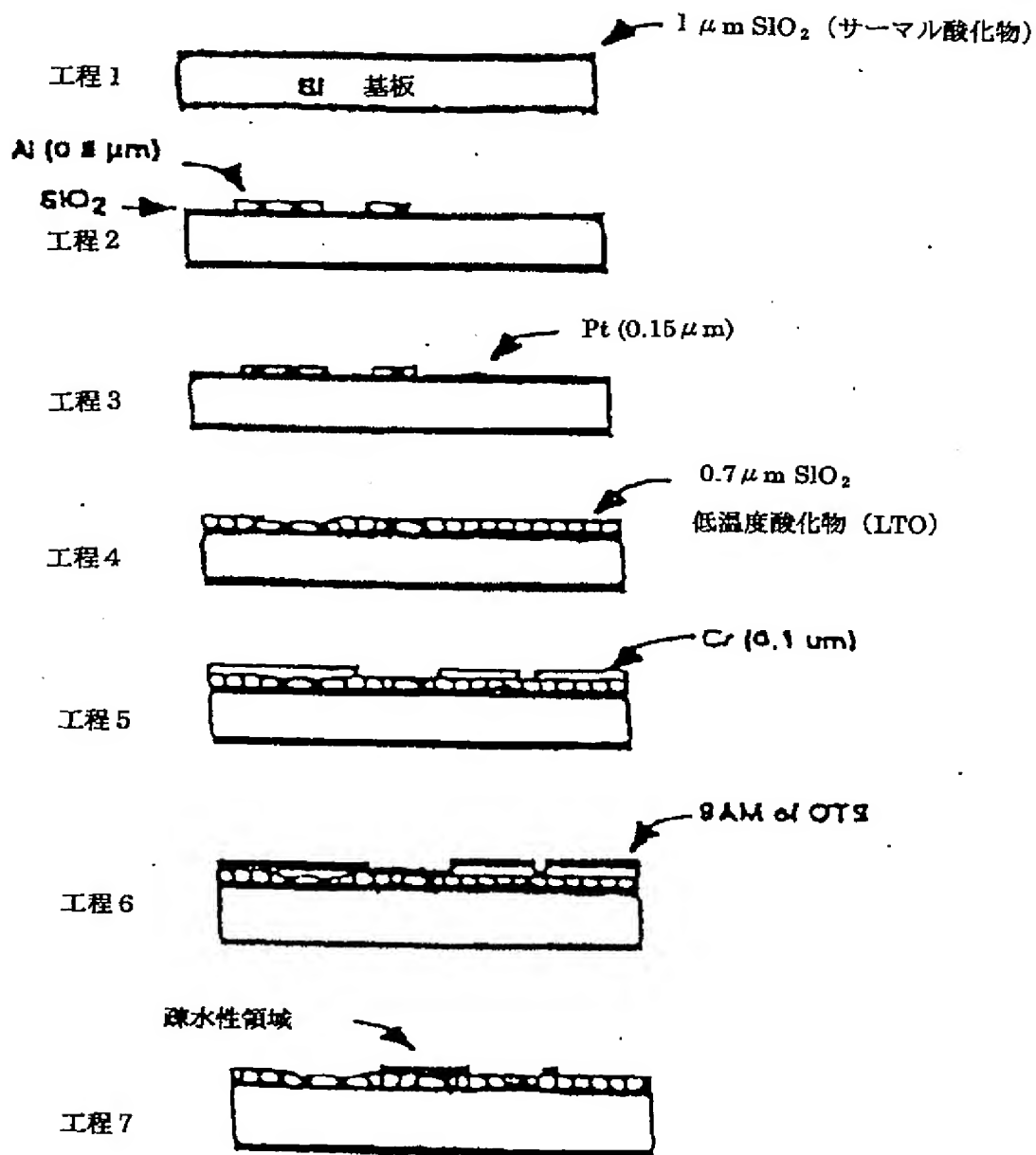


FIGURE 8B

【図8C】

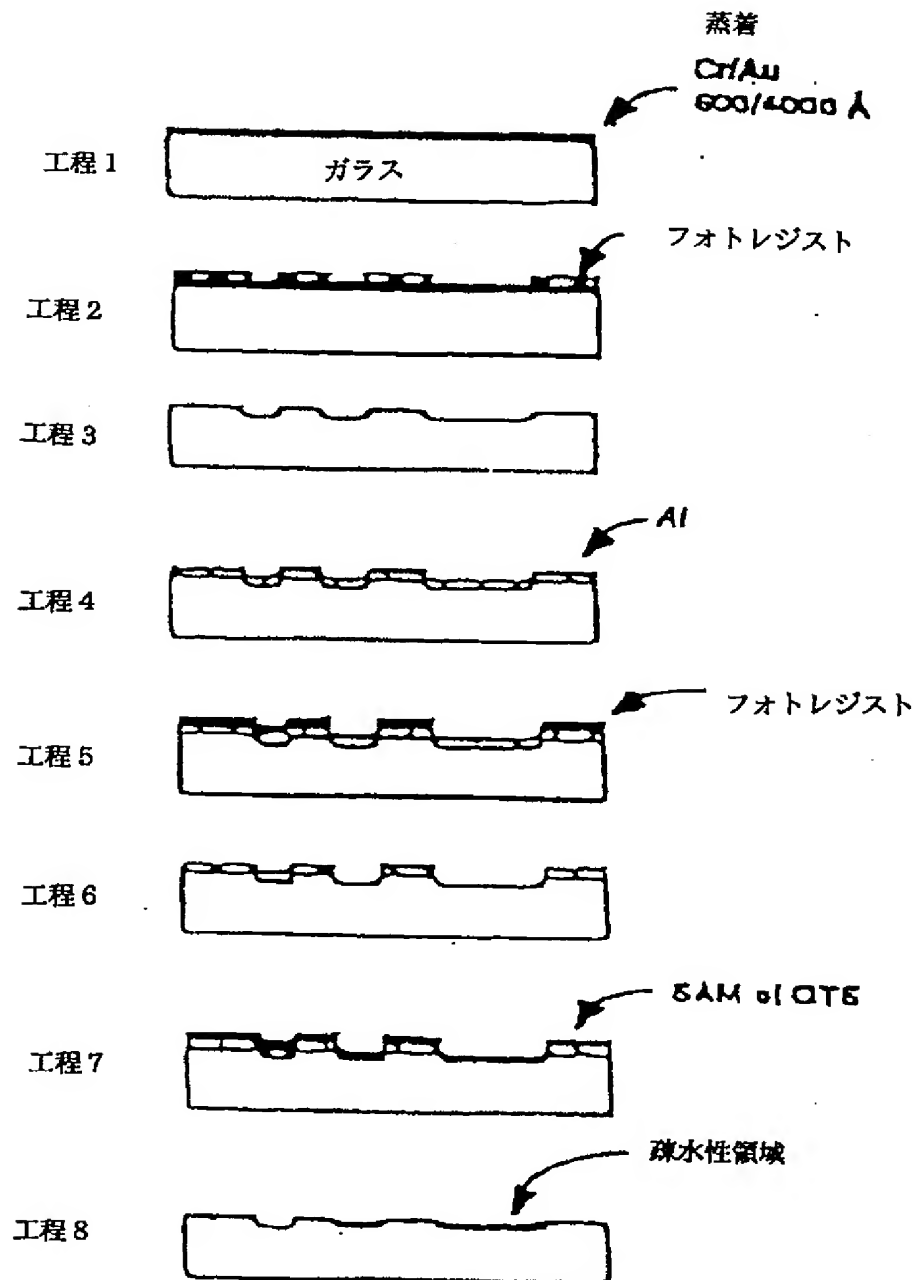


FIGURE 8C

【図 9】

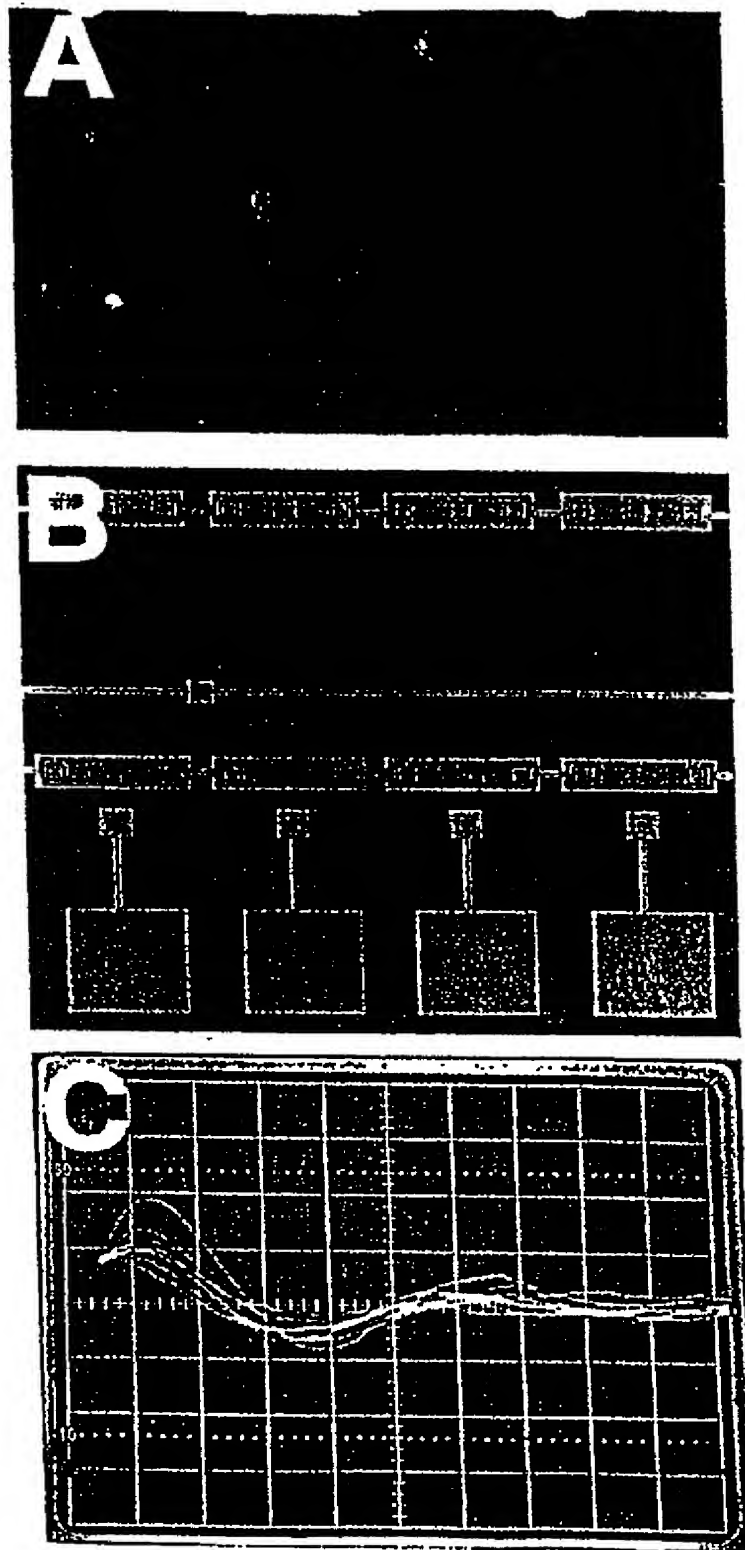
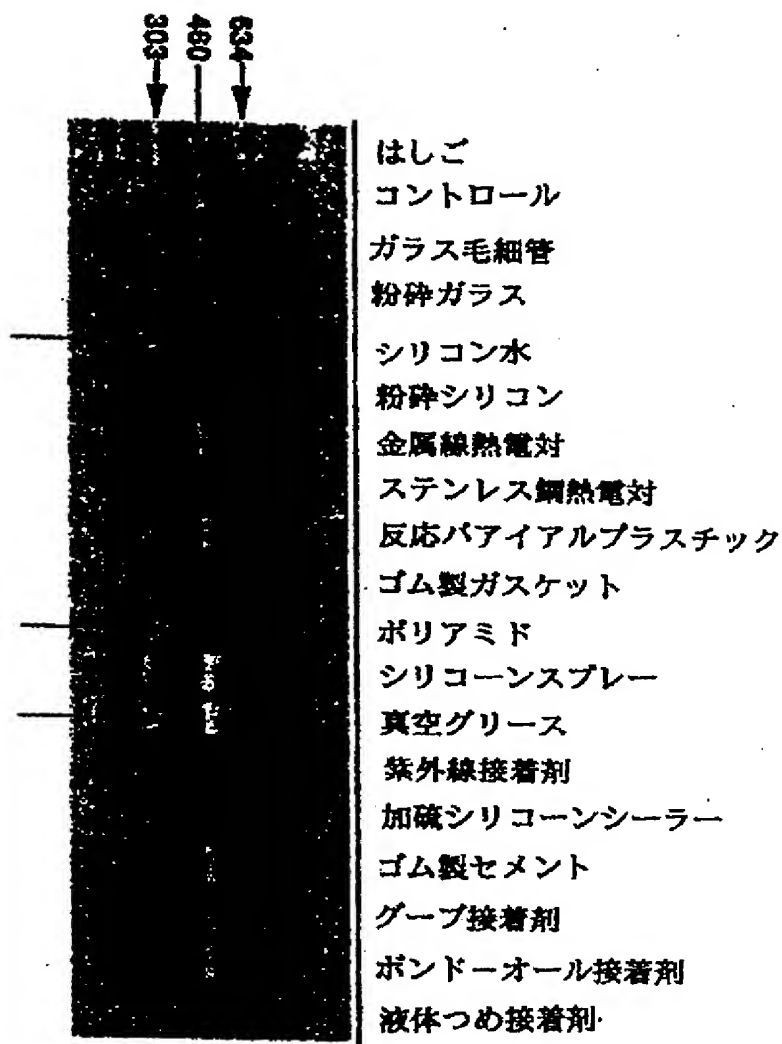


FIGURE 9

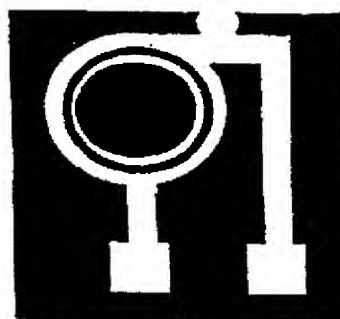
【図10】

FIG.10

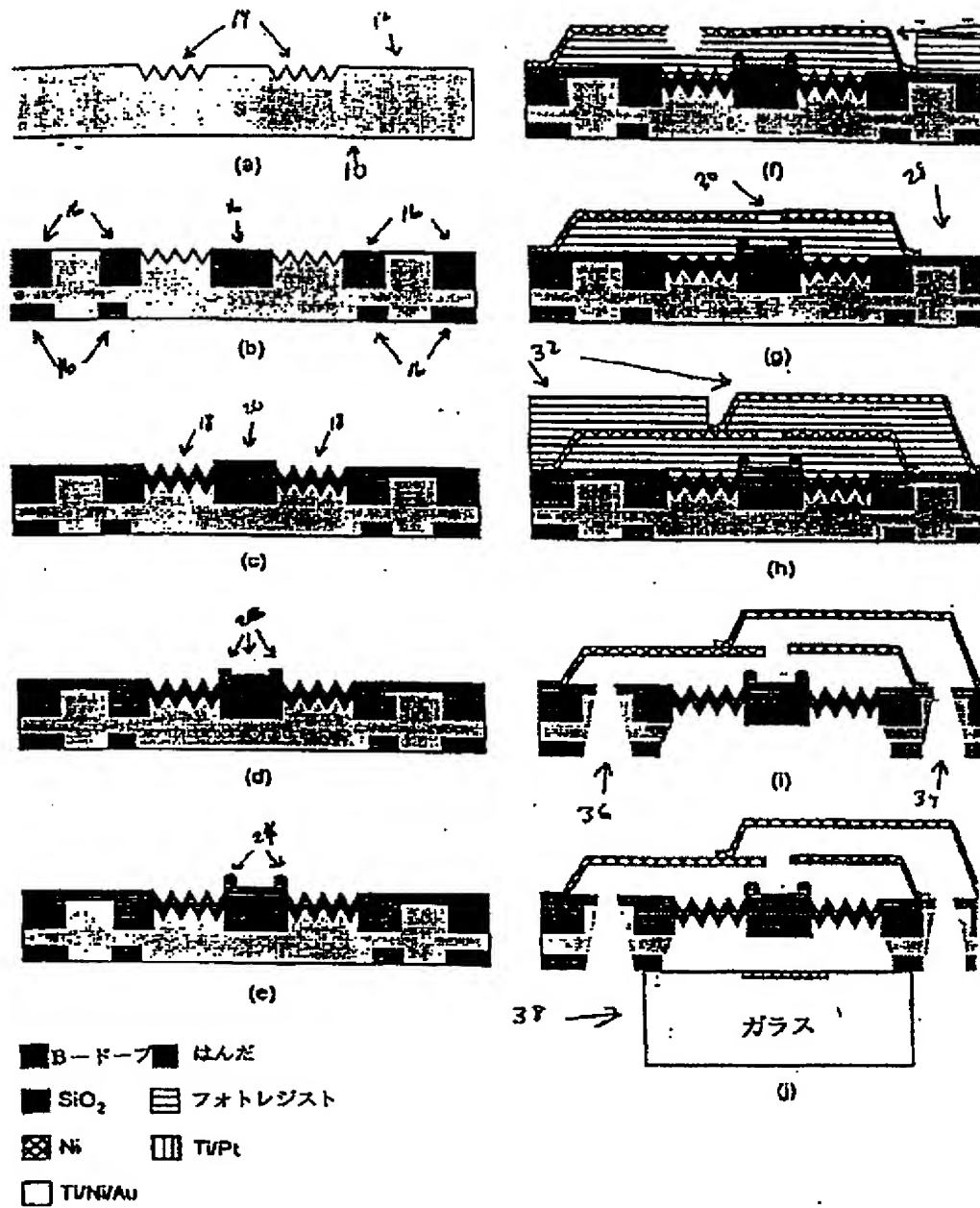


標準試薬量によるPCR結果

【図11】



【図12】



【図13】

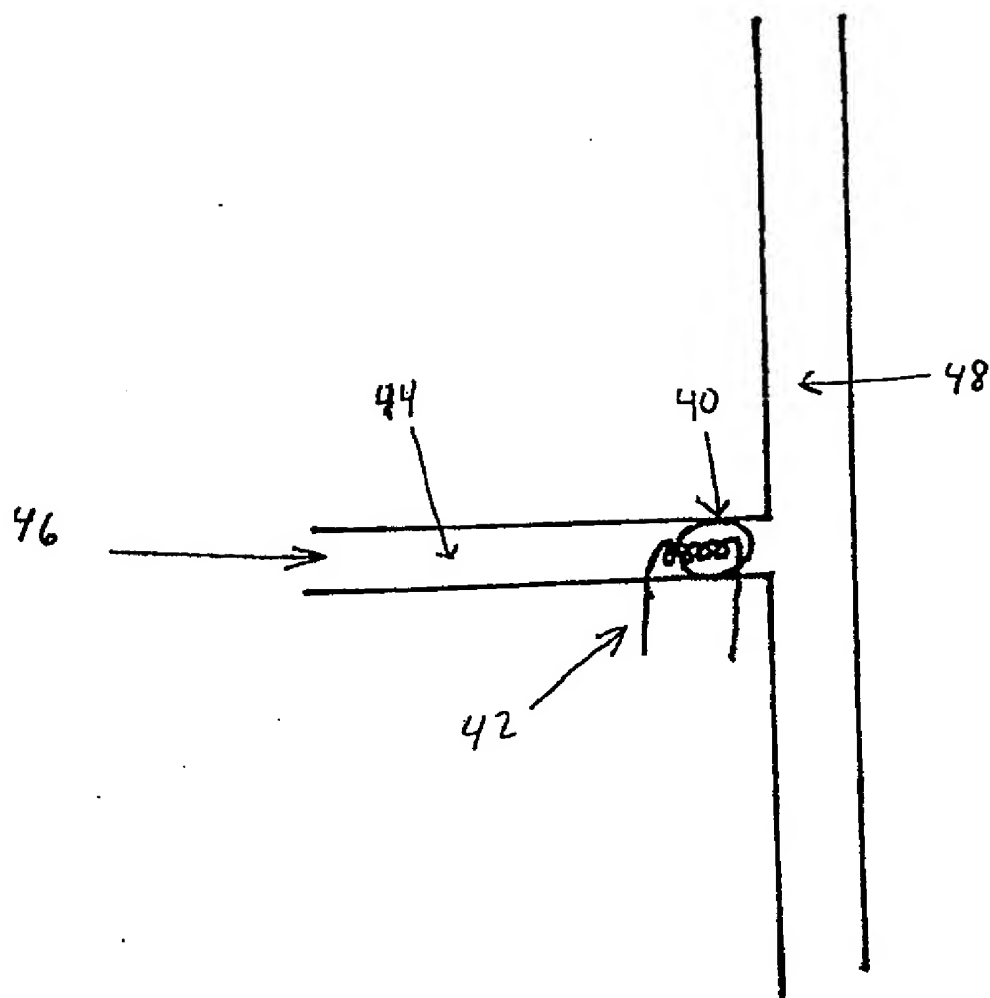


FIGURE 13

【図14】

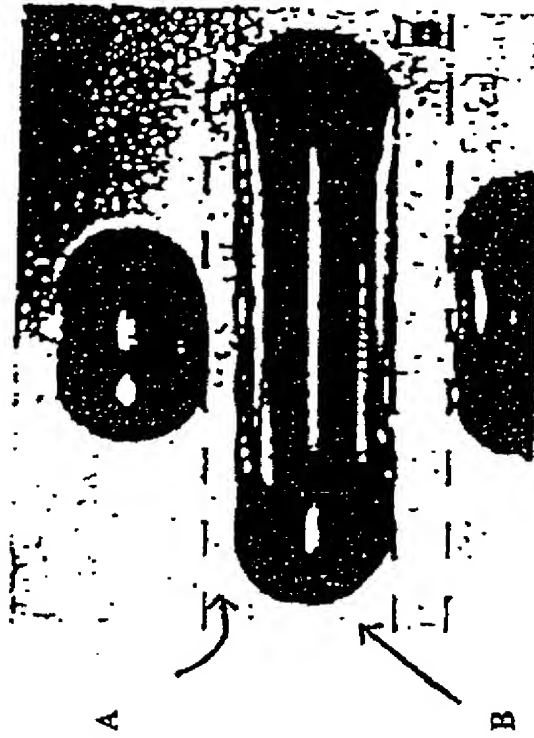


FIGURE 14

【図15】

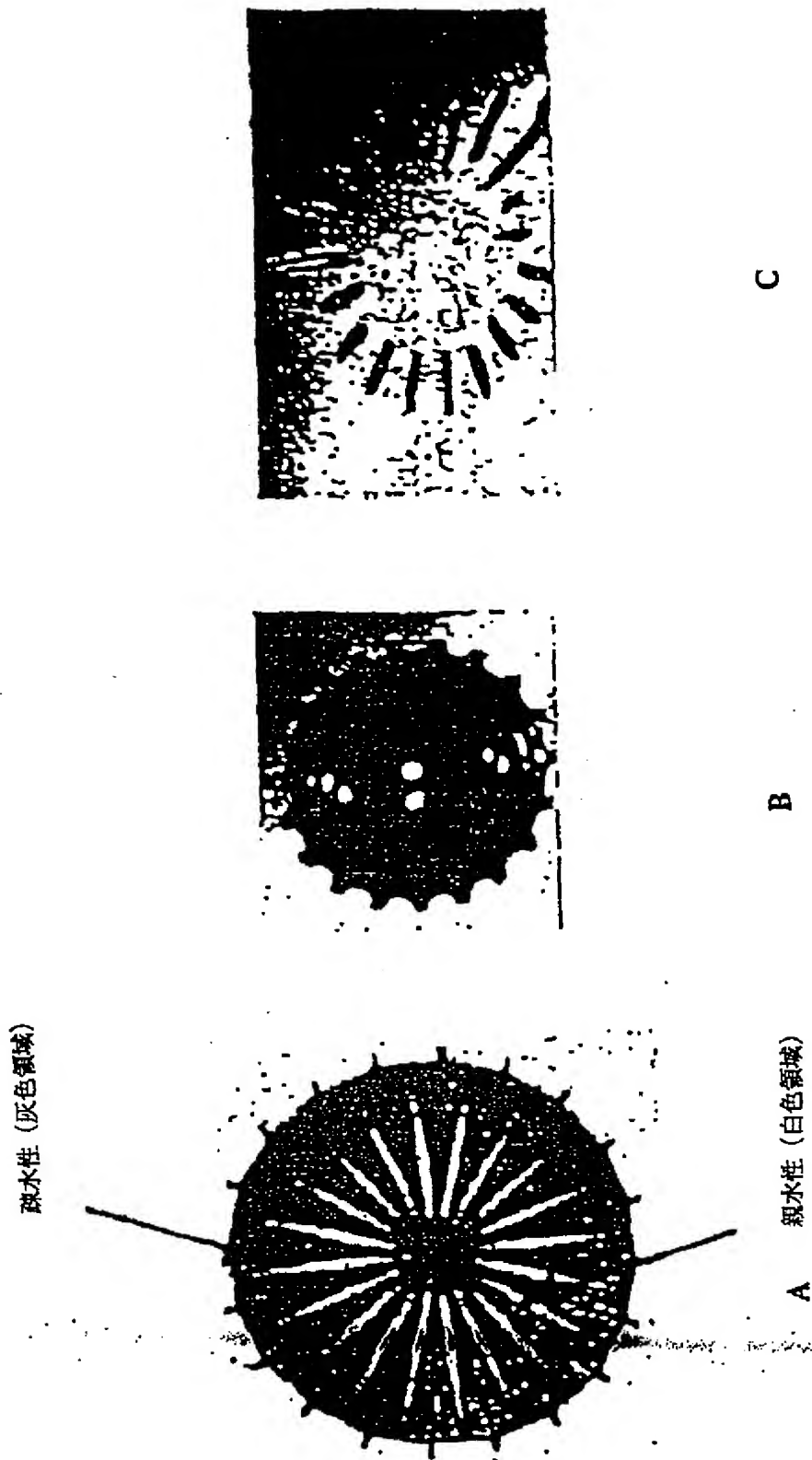


FIGURE 15

【図16A】

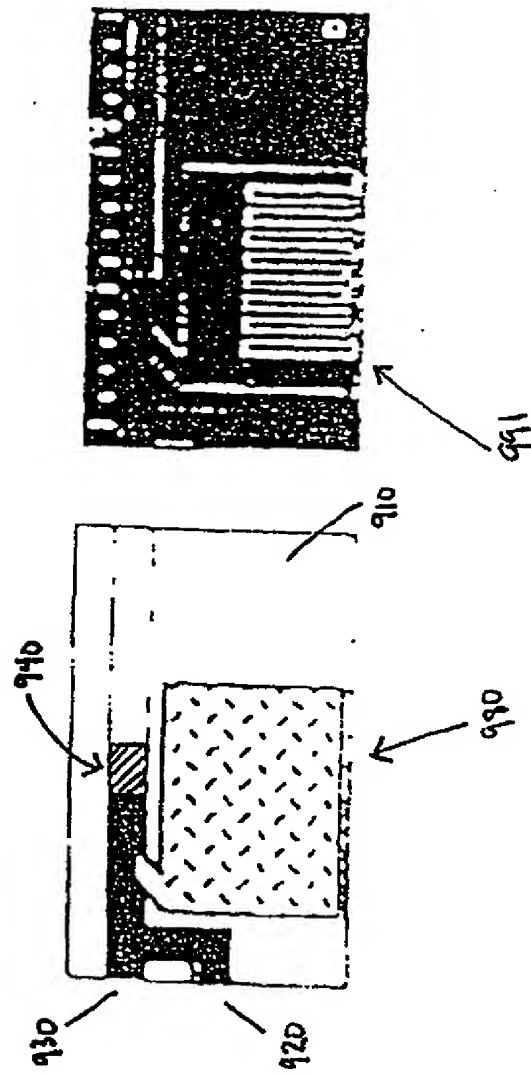


FIGURE 16A

【図16B】

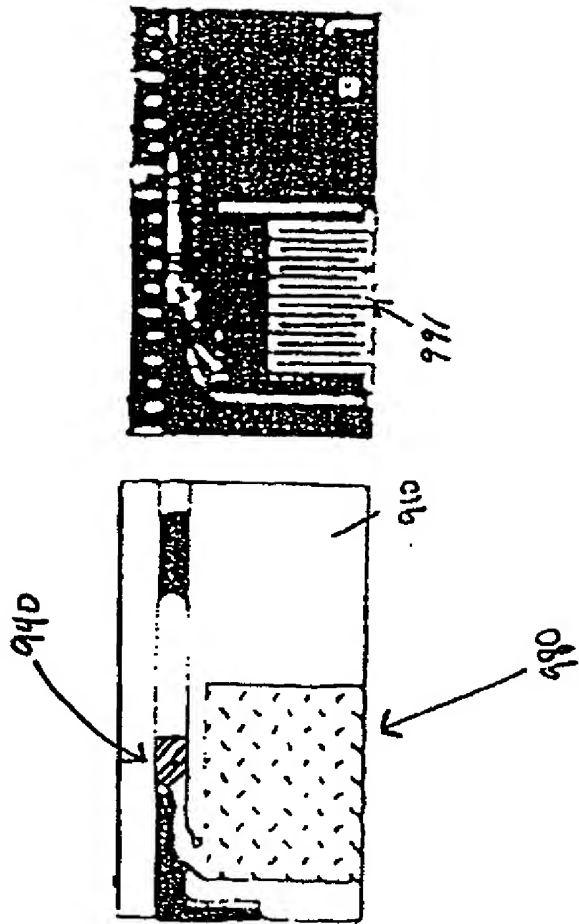


FIGURE 16B

【図16C】

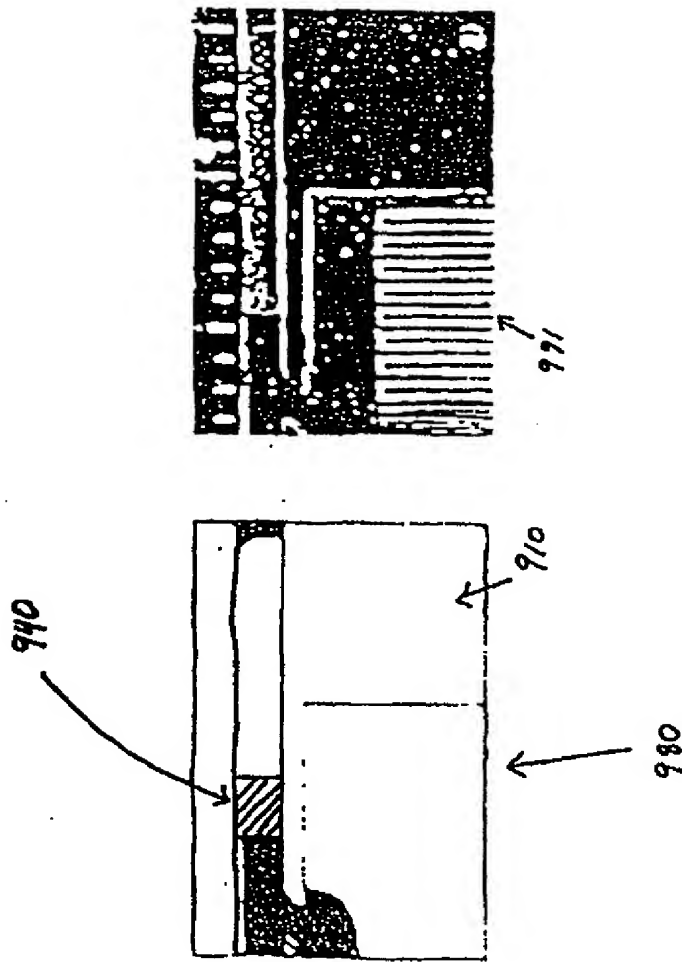


FIGURE 16C

【図 16D】

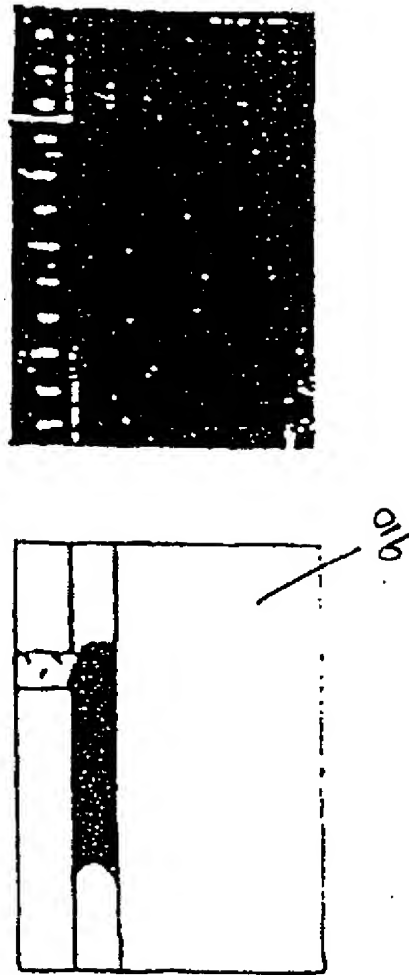


FIGURE 16D

【図16E】

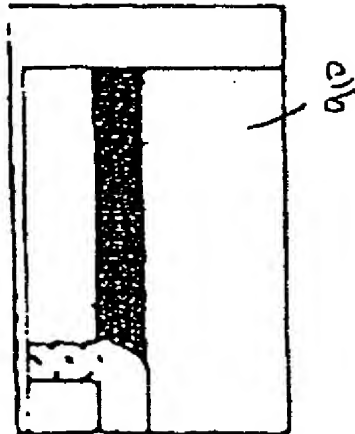
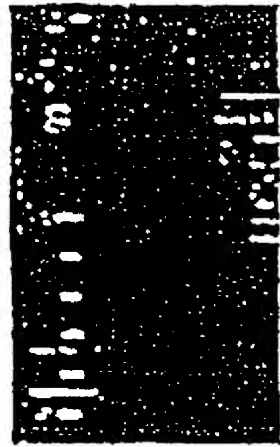
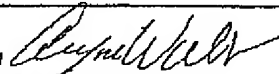


FIGURE 16E

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/19960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : G01N 1/10 US CL : 436/180 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/180; 422/56, 58, 61, 68.1, 100, 102 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,223,226 A (WITTMER et al) 29 June, 1993 (29-06-93), see entire document.	1,6,14
Y	US 4,919,892 A (PLUMB) 24 April 1990 (24-04-90), see entire document.	2-5,7-13,15-20
A	US 5,494,639 A (GRZEGORZEWSKI) 27 February 1996 (27-02-96), see entire document.	1-20
A	US 5,304,487 A (WILDING et al) 19 April 1994 (19-04-94), see entire document.	1-20
A	US 5,275,787 A (YUGUCHI et al) 04 January 1994, see entire document.	1-20
A	US 4,963,498 A (HILLMAN et al) 16 October 1990 (16-10-90), see entire document.	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 NOVEMBER 1998		Date of mailing of the international search report 30 DEC 1998
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer HAROLD Y. PYON  Telephone No. (703) 308-0651

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/19960

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,599,315 A (TERASAKI et al) 08 July 1986 (08-07-86), see entire document.	1-20
A	US 4,439,526 A (COLUMBUS) 27 March 1984 (27-03-84), see entire document.	1-20

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ゴゴイ, ビシュヌ

アメリカ合州国 85250 アリゾナ州, ス
コッツデール, ノース 78ティーエイチ
ストリート ナンバー2051 5995

(72)発明者 バーンズ, マーク, エイ.

アメリカ合州国 48103 ミシガン州, ア
ン アーバー, トレゴ サークル 638

(72)発明者 マストラランジェロ, カルロス, エイチ.

アメリカ合州国 48105 ミシガン州, ア
ン アーバー, クリークビュー コート

5844

Fターム(参考) 2G042 AA10 BD19 CB03 HA02 HA03